



Universidade de Aveiro Departamento de Química

Ano 2009

**Vera Sofia Teles
Almeida**

**Aplicação das técnicas PCR, SSCP e sequenciação
automática na análise de polimorfismos no TLR7 em
lesões do colo do útero**



**Vera Sofia Teles
Almeida**

**Aplicação das técnicas PCR, SSCP e
sequenciação automática na análise de
polimorfismos no TLR7 em lesões do colo do
útero**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica da Doutora Teresa Maria Caldeira Martins do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil e do Professor Doutor Edgar Figueiredo da Cruz e Silva do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Doutor António José de Brito Fonseca Mendes Calado

Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva

Professor Associado Convidado com Agregação do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto - Arguente

Doutora Teresa Maria Caldeira Martins

Investigadora Auxiliar do Serviço de Patologia Molecular do Instituto Português de Oncologia de Coimbra - Orientadora

Prof. Doutor Edgar Figueiredo da Cruz e Silva

Professor Associado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro – Co-orientador

agradecimentos

À Doutora Teresa Martins pela orientação deste projecto, dedicação, disponibilidade permanente e por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Doutor Edgar Cruz e Silva pela co-orientação, pelo incentivo em terminar este projecto e pela disponibilidade sempre demonstrada.

À Vera e à Marta por tudo aquilo que me ensinaram, apoiaram e ajudaram.

Ao Serviço de Imunohemoterapia, em especial à Dr^a Élia Moura Guedes, por ter permitido a conclusão da parte prática deste trabalho, e a todos, em geral, pela ajuda que ofereceram em vários momentos.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a realização desta Dissertação.

À minha família e amigos pelo incentivo e por tolerarem sempre da melhor forma as minhas ausências.

Ao Paulo por toda a ajuda, apoio e paciência...

palavras-chave

HPV, cancro do colo do útero, polimorfismos, TLR7.

resumo

Os factores imunológicos do hospedeiro são muito importantes na susceptibilidade à infecção e na persistência de infecções por HPV e, consequentemente, no desenvolvimento de cancro do colo do útero.

As infecções persistentes por HPV de alto risco são o principal factor de risco para o desenvolvimento de cancro do colo do útero. Embora a infecção por HPV seja necessária, não é suficiente para causar este tipo de cancro.

As respostas imunológicas inata e adquirida são importantes na prevenção e regressão das lesões causadas por HPV. O sistema imunológico inato reconhece características que identificam antígenos estranhos ao organismo, através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), e inicia uma resposta apropriada. Os receptores tipo-Toll (TLR), nomeadamente os TLR7 e 9, são PRRs que podem estar envolvidos no reconhecimento de vírus. A activação de TLRs por componentes virais estimula a resposta imunológica inata através da estimulação da síntese de citocinas, como interferons (IFNs) do tipo I, IL-1 β e IL-6, que podem actuar directamente na replicação viral. Estes sinais levam também ao recrutamento de células imunológicas para os locais de infecção e à activação de células dendríticas, que desencadeiam a resposta imunológica adquirida.

Alterações/ polimorfismos em genes que codificam factores imunológicos do hospedeiro como os TLRs, podem comprometer a resposta imunológica. A investigação de factores genéticos ligados à resposta imunológica poderá ser importante para a compreensão da capacidade distinta de diferentes mulheres para controlar e eliminar a infecção por HPV. O objectivo deste trabalho foi tentar determinar se alterações genéticas no *TLR7* actuariam como factores de risco, ou de protecção, para infecção por HPV e/ou desenvolvimento de cancro do colo do útero.

Estas alterações foram pesquisadas e analisadas utilizando técnicas biomoleculares como a PCR, o SSCP e a sequenciação automática de DNA. Foram pesquisadas alterações na região codificante, zonas de *splicing* e UTRs do *TLR7* em amostras citológicas em que foram identificadas diferentes lesões do colo do útero: células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), lesões de baixo grau (LBG), lesões de alto grau (LAG) e carcinomas, bem como amostras de controlo. Foram identificadas catorze possíveis alterações neste gene, treze na região codificante e uma na 3'UTR. Das alterações identificadas neste estudo, cinco são alterações *missense*, cinco são alterações sinónimas e três são inserções com alteração da pauta de leitura (*frameshift*).

O polimorfismo mais estudado neste trabalho, Gln11Leu, já se encontra descrito na literatura. Não foram observadas quaisquer diferenças significativas, quer no que respeita às frequências alélicas, quer genotípicas, relativamente a indivíduos com e sem infecção, ou com diferentes graus de lesão. Uma vez que este polimorfismo se encontra localizado numa região que inclui o ectodomínio do TLR7, pode ser importante para a resposta imunológica contra o HPV, já que pode comprometer a activação das células através do TLR7.

Nas restantes alterações não foi possível estabelecer qualquer relação entre a infecção por HPV e o grau de lesão já que não nos foi possível determinar o genótipo de um número suficiente de amostras devido a limitações técnicas. Estas poderão ser futuramente ultrapassadas com recurso a uma série de procedimentos que são discutidos neste trabalho.

keywords

HPV, cervical cancer, polymorphisms, TLR7.

abstract

The host immune factors are very important in susceptibility to infection and persistence of HPV infections and, thus, in the development of the cervical cancer. Persistent infections by high-risk HPV are the main risk factor for the development of cervical cancer. Although HPV infection is necessary, it is not sufficient to cause this type of cancer.

The innate and acquired immune responses are important in the prevention and regression of lesions caused by HPV. The innate immune system recognizes foreign antigens through pattern recognition receptors (PRR) and initiates an appropriate response. Toll-like receptors (TLR), in particular TLR7 and 9, are PRRs that may be involved in virals recognition. Activation of TLRs by viral components stimulates the innate immune response by promoting the synthesis of cytokines, such as type I interferons (IFNs), IL-1 β and IL-6, which can act directly on viral replication. These signals also lead to the recruitment of immune cells to the infection sites and to activation of dendritic cells, which trigger the acquired immune response.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding host immune factors, such as TLRs, may compromise the immune response. The investigation of genetic factors related to the host immune response may be important for understanding the distinctive ability of different women to control and eliminate HPV infection. The aim of this study was to determine if genetic changes in *TLR7* could act as risk factors for HPV infection and/or development of cervical cancer.

TLR7 genetic changes were screened and analyzed using molecular techniques such as PCR, SSCP and automatic DNA sequencing. We have analysed the *TLR7* coding region, *splicing* areas and UTRs in cytologic samples of women that harboured cervical lesions of different grades:

atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS), low-grade lesions (LSIL), high-grade lesions (HSIL) and carcinomas; as well as control samples. Fourteen putative genetic changes were found, thirteen of which were located in the coding region and one in the 3'UTR. Five of them were missense changes, five were synonymous changes and three were frameshift insertions.

The polymorphism that was more extensively studied in this work, Gln11Leu, was already described in the literature. No significant differences were found in allelic and genotypic frequencies with regard to HPV infection and/or grade of cervical lesion. Since this polymorphism is located in a region that includes the ectodomain of the TLR7, it may be important for the immune response against HPV as it may compromise cell activation through TLR7.

With regard to the other *TLR7* genetic changes, it was not possible to establish any association between any of these changes and HPV infection and/or cervical cancer development, as the number of genotyped sample was too small. This was due to technical limitations. In this work we discuss a set of procedures that may be used in the future to overcome these limitations.

Índice

Lista de Abreviaturas

1. Introdução.....	7
1.1 ... Cancro do Colo do Útero.....	7
1.1.1 Epidemiologia	7
1.1.2 O Papilomavírus Humano e o Cancro do Colo do Útero	8
1.1.3 Incidência e Factores de risco	10
1.2 ... Papilomavírus Humano	12
1.2.2 Genoma e Biologia do HPV	13
1.2.3 Infecção por HPV	15
1.3 ... Resposta Anti-viral.....	19
1.3.1 Imunidade Inata <i>versus</i> Imunidade Adquirida	19
1.3.2 Receptores de Reconhecimento de Padrões: os receptores tipo-Toll.....	22
1.3.3 Vias de Sinalização dos receptores tipo-Toll	25
1.3.4 TLR7	26
1.3.5 Mecanismos de evasão imunitária do HPV	28
1.4 ... Métodos Biomoleculares utilizados no estudo do <i>TLR7</i>	29
1.4.1 O gene <i>TLR7</i>	29
1.4.2 Reacção em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR)	29
1.4.3 Polimorfismo conformacional de cadeia simples (<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> , SSCP).....	32
1.4.4 Sequenciação automática de DNA	34
2. Objectivos	38
3. Material e Métodos.....	40
3.1 ... Sujeitos.....	40

3.2 ... Extracção de DNA	41
3.2.1 Colheita do material	41
3.2.2 Digestão celular	41
3.2.3 Extracção de DNA usando fenol/clorofórmio	41
3.2.4 Precipitação de DNA	42
3.3 ... Detecção de HPV	42
3.4 ... Pesquisa de alterações no gene <i>TLR7</i>	43
3.4.1 Amplificação por PCR.....	43
3.4.2 Pesquisa de alterações genéticas por SSCP.....	45
3.4.3 Sequenciação automática de DNA	46
3.5 ... Análise Estatística	46
4. Resultados.....	48
4.1 ... Fragmento 3 (nt 18 345 a 18 627)	49
4.1.1 Leu8Leu	50
4.1.2 Gln11Leu	51
4.2 ... Fragmento 8 (nt 19 381 a 19 642)	53
4.2.1 Glu352Lys	54
4.2.2 Met360Ile	54
4.2.3 Leu369Leu	55
4.3 ... Fragmento 9 (nt 19 540 a 19 817)	56
4.3.1 c.1191_1192InsG	56
4.4 ... Fragmento 10 (nt 19 727 a 19 973)	57
4.4.1 c.1365_1366InsA	58
4.5 ... Fragmento 12 (nt 20 041 a 20 300)	59
4.5.1 c.1686_1687InsA	59
4.6 ... Fragmento 15 (nt 20 547 a 20 799)	59

4.6.1 Thr739Thr.....	61
4.6.2 Phe742Leu.....	62
4.7 ... Fragmento 16 (nt 20 721 a 21 005)	63
4.7.1 Thr801Thr.....	64
4.7.2 Ser824Arg.....	65
4.8 ... Fragmento 18 (nucleótido 21 168 a 21 481)	66
4.8.1 Pro994Pro.....	66
4.9 ... Fragmento 20 (nt 21 601 a 21 834)	67
4.9.1 3'UTR+161	68
5. Discussão.....	70
6. Conclusões e Perspectivas Futuras	78
7. Referências Bibliográficas.....	80

Lista de abreviaturas

A - adenina

APC – células apresentadoras de antígeno

APS – persulfato de amónio

ASCUS – células escamosas atípicas de significado indeterminado

ATP – adenosina trifosfato

C – citosina

CIN – neoplasia cervical intraepitelial

DC – células dendríticas

DNA – ácido desoxirribonucleico

ddNTP – didesoxinucleótido trifosfato

dNTP – desoxinucleótido trifosfato

E6AP - proteína associada à E6

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

G - guanina

HCV – vírus da hepatite C

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HLA – antígenos leucocitários humanos

HPV – papilomavírus humano

HSIL - *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*

IFN – interferon

IL – interleuquina

IL-1R – receptor da interleuquina 1

IRF – factores regulatórios de interferons

LAG – Lesão de alto grau

LBG – Lesão de baixo grau

LCR – *long control region*

LRR – repetições ricas em leucinas

LSIL – *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*

MDE – *mutation detection enhancement*

MHC – complexo major de histocompatibilidade

miRNA - microRNA

mRNA – RNA mensageiro

MyD88 – factor de diferenciação mielóide 88

NF-κB - nuclear factor kappa B

NK – *Natural Killer*

nt - nucleótido

ORF – *Open Reading Frames* ou fases abertas de leitura

PAMPs – *pathogen-associated molecular patterns*

PBS – *phosphate buffered saline*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

pDC - célula dendrítica plasmocitóide

PRR – *pattern recognition receptor*

RFLP – *restriction fragment length polymorphism*

RNA – ácido ribonucleico

SDS – dodecil sulfato de sódio

SIL - *intraepithelial lesions*

SSCP – *single strand conformation polymorphism*

T - Timina

TAE – Tris-ácido acético-EDTA

TBE – Tris-ácido bórico-EDTA

T CD4⁺ – linfócitos T de ajuda

T CD8⁺ – linfócitos T citotóxicos

TIR – *Toll/IL-1 receptor*

TIRAP/MAL – proteína adaptadora com domínio TIR/adaptador tipo MyD88

TLR – receptores tipo *Toll*

TNF – factor de necrose tumoral

TRAM – molécula adaptadora relacionada com TRIF

TRIF – adaptador com domínio TIR, indutor de IFNβ

tRNA – RNA de transferência

UTR- *untranslated region*

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

1.1 Cancro do Colo do Útero

1.1.1 Epidemiologia

O cancro do colo do útero é o segundo cancro mais frequente no sexo feminino em todo o mundo e representa cerca de 10% de todos os cancros na mulher (Buitrago-Pérez *et al.*, 2009; Munoz *et al.*, 2003; Nicol *et al.*, 2005)

Nos anos 90, estudos epidemiológicos e de Biologia Molecular estabeleceram uma relação causal entre infecções persistentes por Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco e o desenvolvimento de cancro do colo do útero (Bekkers *et al.*, 2004; Bosch & de Sanjose, 2007; Castle, 2009; Insinga *et al.*, 2009; Moore, 2006; Munoz *et al.*, 2003). O HPV está também associado a carcinomas do ânus, vulva, vagina, pénis, cabeça e pescoço e orofaringe, bem como a verrugas ano-genitais e papilomatoses respiratórias (Ault, 2006; Hsueh, 2009; Insinga *et al.*, 2009; Pyeon *et al.*, 2009)

Estima-se que as infecções genitais por HPV sejam responsáveis por aproximadamente 500 000 casos de carcinoma do colo do útero por ano. Destes, 275 000 resultam em morte e cerca de $\frac{3}{4}$ ocorrem em países em desenvolvimento (Insinga *et al.*, 2009; Moore, 2006; Nicol *et al.*, 2005; Rosa *et al.*, 2009). A incidência e mortalidade estão geralmente relacionadas, mas algumas regiões, como África, apresentam níveis de mortalidade anormalmente elevados. Em países subdesenvolvidos, menos de 50% das mulheres com cancro do colo do útero sobrevivem para além de 5 anos após o diagnóstico, e muitas das vítimas são múltiparas em idade fértil. Em contraste, a sobrevida aos 5 anos, em países desenvolvidos, é de cerca de 66% (Fig. 1).

Em Portugal, a incidência é de 13 a 14 casos por 100 000 mulheres, ocorrendo quase 1000 novos casos por ano. O número de mortes por ano devido a esta doença é de cerca de 350.

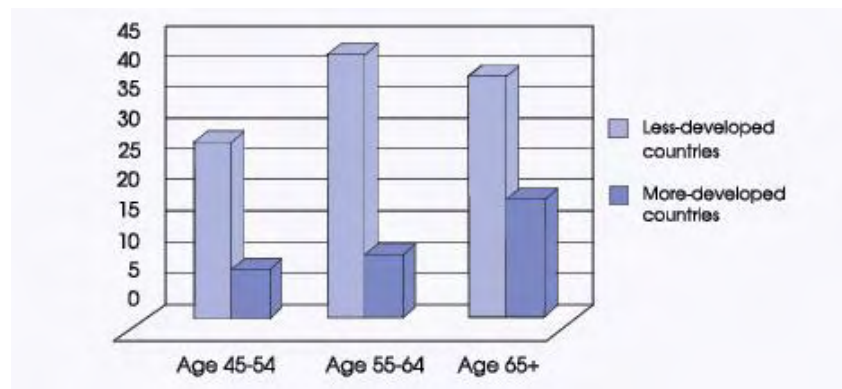


Figura 1. Índices de mortalidade por cancro do colo do útero, por idades, em países desenvolvidos e em desenvolvimento (por 100 000 mulheres). Observa-se uma taxa de mortalidade mais elevada para países menos desenvolvidos, em todas as faixas etárias, relativamente a países mais desenvolvidos. Pensa-se que tal se deva maioritariamente à falta de programas de rastreio nos países em desenvolvimento. Adaptado de <http://www.rho.org/>.

1.1.2 O Papilomavírus Humano e o Cancro do Colo do Útero

O cancro do colo do útero é precedido por uma série de lesões intra-epiteliais. Estas lesões pré-cancerosas do epitélio pavimentoso estratificado do colo do útero designam-se histologicamente por CIN (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*). Podem ser distinguidos três graus de lesões: CIN I (displasia leve), CIN II (displasia moderada) e CIN III (displasia grave/carcinoma *in situ*), que na classificação citológica correspondem a apenas dois grupos: baixo (CIN I) e alto (CIN II e III) grau. Segundo a classificação citológica de Bethesda, as lesões pré-malignas do colo do útero podem ser incluídas em dois grandes grupos: Lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (*Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion* – LSIL) e Lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau (*High Grade Squamous Intraepithelial Lesion* – HSIL). As LSIL correspondem a alterações celulares associadas ao HPV e com displasia ligeira (CIN I), que ocorrem sobretudo em mulheres entre os 25 e os 35 anos. As HSIL englobam alterações celulares associadas com displasia moderada (CIN II), displasia marcada (CIN III) e carcinoma *in situ*, que ocorrem sobretudo em mulheres entre os 30 e os 40 anos, embora possam

aparecer noutras idades (Nicol *et al.*, 2005). Considera-se que as lesões CIN III são obrigatoriamente lesões precursoras de cancro do colo do útero (Fig. 2) (Nam *et al.*, 2009).

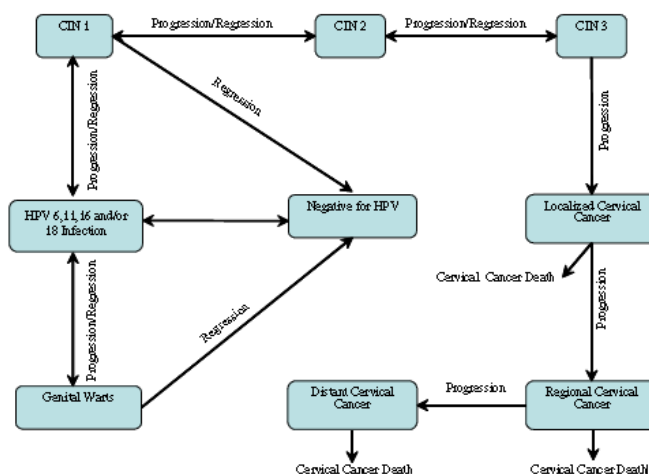


Figura 2. Visão geral da progressão/regressão das infecções por HPV. As infecções por HPV podem causar verrugas genitais ou dar origem a lesões CIN I, II e III e cancro do colo do útero. Estas lesões podem regredir naturalmente, excepto quando há progressão para cancro do colo do útero (Insinga *et al.*, 2009).

Uma infecção por HPV é o factor de risco mais importante para o desenvolvimento de lesões intra-epiteliais e carcinomas invasivos (Waldemar *et al.*, 2006). O seu envolvimento na patogénese do cancro do colo do útero foi estabelecido com base em várias observações: uma elevada prevalência do DNA deste vírus nas lesões pré-invasivas e invasivas, identificação da actividade transcricional do HPV em neoplasias cervicais e a descoberta de que os seus oncogenes podem mediar uma transformação maligna em estudos efectuados com ratinhos transgénicos (Moore, 2006; Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2008). A associação entre a carga viral e o aumento da frequência de carcinoma do colo do útero é mais um factor que apoia o envolvimento do HPV nesta doença (Rosa *et al.*, 2009). No entanto, apesar de todas as evidências, nem todos os carcinomas apresentam DNA viral. Aproximadamente 90% de casos de cancro do colo do útero apresentam positividade para HPV (Herbert & Coffin, 2008). Os 10 % de cancro de

colo do útero em que não é detectado DNA viral poder-se-ão dever a carcinogénese mediada por mutação da p53 ou a tipos de HPV que ainda não se encontram identificados e/ou que não são detectados por métodos de biologia molecular que são direccionados para genótipos específicos. A p53, como guardiã da integridade do genoma, induz apoptose quando há danos no DNA. Quando esta é inactivada, por mutação, a probabilidade de células geneticamente danificadas serem eliminadas encontra-se reduzida, o que pode contribuir para processos carcinogénicos (Tsai *et al.*, 2009; Waldemar *et al.*, 2006).

1.1.3 Incidência e Factores de risco

Tendo em conta o aumento da incidência da infecção por HPV e a sua associação com o cancro do colo do útero, é de salientar os factores de risco envolvidos. Estes incluem factores ambientais, comportamentais e genéticos (Herbert & Coffin, 2008).

Nenhum outro factor de risco para o cancro de colo do útero tem uma relevância tão grande quanto o HPV. No entanto, a infecção por HPV é necessária, mas não suficiente, para causar este tipo de cancro. Outros factores podem estar envolvidos como a multiparidade, o uso de contraceptivos orais, o tabagismo, a imunossupressão, co-infecções com outros microorganismos (por ex. *Chlamydia trachomatis*, vírus Herpes simplex) e deficiências nutricionais. Um início precoce da vida sexual, o número de parceiros sexuais e a história de doenças sexualmente transmissíveis estão também ligados ao processo de infecção por HPV (Rosa *et al.*, 2009).

Tem-se observado um aumento da incidência de neoplasia cervical intra-epitelial, em especial em mulheres jovens, em plena vida reprodutiva e com maior actividade sexual, sendo lícita a sua colocação no grupo das doenças sexualmente transmissíveis (Castro, 2003; Nicol *et al.*, 2005; Palefsky, 2006). Estima-se que anualmente há mais novos casos de infecção por HPV do que de qualquer outra doença sexualmente transmissível (Herbert & Coffin, 2008).

A existência de múltiplos parceiros sexuais é considerado um factor de risco, pois verificou-se que a incidência das infecções por HPV aumentava com o número de parceiros (Herbert & Coffin, 2008; Rosa *et al.*, 2009).

Estudos epidemiológicos demonstraram que a multiparidade (mulheres com sete ou mais gravidezes de termo) e o uso prolongado de contraceptivos orais (superior a 5 anos) são dois factores de risco para o desenvolvimento do cancro do colo do útero. O mecanismo pelo qual as hormonas (estrogénios) influenciam a carcinogénese ainda não está bem esclarecido, mas estudos efectuados indicam que estas promovem a integração do DNA do HPV no genoma do hospedeiro com desregulação da expressão das proteínas E6 e E7 (Herbert & Coffin, 2008; Rosa *et al.*, 2009). Relativamente à idade da primeira gestação, foi encontrada uma maior incidência de infecção em mulheres que engravidaram precoce ou tardiamente.

O tabagismo é igualmente um factor de risco importante que parece estar associado à progressão de lesões de baixo grau (CIN I) para lesões de alto grau (CIN II e III) (Herbert & Coffin, 2008). Foi encontrada nicotina e outras substâncias carcinogénicas presentes no tabaco, em concentrações elevadas, em células epiteliais cervicais que tinham DNA de HPV integrado no seu genoma (Herbert & Coffin, 2008; Rosa *et al.*, 2009).

Indivíduos imunodeprimidos, como consequência de uma infecção por HIV, apresentam um aumento na prevalência de infecções por HPV e de lesões de alto grau (Stanley, 2006). A malignidade depende da duração da imunossupressão e do grau de diminuição da resposta imunológica. Contudo, as lesões por HPV ocorrem, na maior parte das vezes, em indivíduos sem quaisquer alterações no seu sistema imunológico.

Os hábitos alimentares também estão associados ao desenvolvimento de cancro do colo do útero. Dietas pobres em frutas e vegetais estão associadas a um aumento de risco. Esta associação parece ser secundária à falta de determinadas vitaminas e minerais, nomeadamente vitamina C, cobre e zinco (Herbert & Coffin, 2008; Rosa *et al.*, 2009).

Um outro factor que merece atenção, principalmente quando se considera a possibilidade do desenvolvimento de vacinas, é a existência de infecções múltiplas. Vários estudos mostraram que tal situação é comum, ocorrendo em 20 a 30% dos casos. A idade e o número de parceiros sexuais, assim como a positividade para o HIV, estão mais relacionados com infecções múltiplas (Moore, 2006; Palefsky, 2006). Os indivíduos infectados com HIV constituem o grupo de maior risco de infecção e de persistência de HPV, sendo infectados em larga escala por vários tipos de HPV. Todavia, parece não haver um aumento do risco para a progressão para cancro pelo facto de as infecções serem múltiplas ou simples.

Um outro factor de risco diz respeito ao uso de DES (*diethylstilbestrol*) na gravidez. Esta substância foi utilizada nas décadas de 40 a 70 para prevenir abortos espontâneos. Aproximadamente 1 em 1000 mulheres expostas ao DES no útero desenvolveram adenocarcinoma de células claras do colo do útero ou da vagina (Herbert & Coffin, 2008).

1.2 Papilomavírus Humano

1.2.1 Classificação de HPV

O HPV é membro da família *Papillomaviridae* (de Villiers *et al.*, 2004). Actualmente estão descritos e totalmente identificados cerca de 130 genótipos de HPV (de Villiers *et al.*, 2004; Stanley *et al.*, 2007), mas pelo menos mais 100 tipos estão parcialmente sequenciados (Hoory *et al.*, 2008). A homologia das sequências dos vários HPV e as pequenas variações entre elas permitiu a classificação dos HPV em géneros, espécies, tipos, subtipos e variantes. Esta classificação baseou-se na comparação das sequências que codificam as proteínas E6, E7 e L1 (Hoory *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2009). São considerados tipos, os que apresentarem menos de 90% de homologia nas sequências que codificam as proteínas E6, E7 e L1 (Cobo *et al.*, 2009; Stanley *et al.*, 2007), subtipos os que apresentarem 90 a 98% e variantes os que apresentarem mais de 98% de homologia (de Villiers *et al.*, 2004).

Estão descritos 16 géneros diferentes. O género clinicamente mais importante é o α -*papillomavirus* que contém todos os tipos de HPV associados a lesões nas mucosas. Os β -*papillomavirus* incluem todos os tipos de vírus associados a epidermodisplasias verruciformes (Cobo *et al.*, 2009; Stanley *et al.*, 2007).

Do ponto de vista epidemiológico e com base na associação dos diferentes HPV com o cancro do colo do útero e/ou lesões precursoras, os HPV foram classificados em tipos de alto e de baixo risco. Os tipos de alto risco estão predominantemente associados a cancro do colo do útero, enquanto que os tipos de baixo risco são comumente detectados em verrugas genitais (Waldemar *et al.*, 2006). Actualmente, são distinguidos dois grupos adicionais: de alto risco provável e de risco indeterminado (Cobo *et al.*, 2009). Considera-

se que os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 são de alto risco, enquanto os tipos 6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89 são classificados como de baixo risco (Munoz *et al.*, 2003). Os HPV de alto risco provável incluem os tipos 26, 53, 66, 68, 73 e 82, e os de risco indeterminado os tipos 30, 32, 34, 62, 67, 69, 71, 74, 83, 84, 85, 86, 87, 90 e 91 (Nobre *et al.*, 2008). Cerca de 40 tipos de HPV mucosatrópicos são responsáveis pela infecção dos epitélios do tracto ano-genital e estão subdivididos de acordo com a classificação anterior (Hsueh, 2009). 95% dos cancros do colo do útero estão maioritariamente associados a oito tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58 (Howley, 2006; Schiffman *et al.*, 2009). Apesar de ainda haver dúvidas na categorização de alguns tipos de HPV, sabe-se que o HPV 16 está presente em 50-70% dos carcinomas e tem forte potencial oncogénico. O HPV 18, presente em 7-20% dos casos, também é muito importante, particularmente em adenocarcinomas (Schiffman *et al.*, 2009). Deste modo, infecções persistentes com tipos de HPV de alto risco são determinantes na patogénese do carcinoma do colo do útero (Herbert & Coffin, 2008), e são estes que estão frequentemente integrados no genoma da célula hospedeira (Kadaja *et al.*, 2009).

1.2.2 Genoma e Biologia do HPV

O HPV foi identificado no final da década de 60 do século passado (Nicol *et al.*, 2005), e a primeira descrição de células alteradas por este vírus no epitélio vaginal coube a Geórgios Papanicolau (Bamforth *et al.*, 1956).

Os HPV são pequenos vírus de DNA circular de cadeia dupla e o seu genoma é constituído por cerca de 8000 pares de bases, que codificam 300 000 daltons de proteína (de Villiers *et al.*, 2004; Stanley, 2006). Apesar do seu pequeno tamanho, a sua biologia molecular é muito complexa (de Villiers *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, 2009). Possuem uma cápside icosaédrica de 55nm, com 72 capsómeros, e não contêm invólucro lipídico (Hoory *et al.*, 2008; Nicol *et al.*, 2005; Rosa *et al.*, 2009).

Apenas uma das cadeias do DNA viral serve de molde para a expressão dos genes virais, permitindo a codificação de transcritos de RNAm. Todas as regiões codificantes, denominadas de *open reading frames* (ORFs), de tamanho aproximado de 400 bases, estão localizadas nesta única cadeia (Howley, 2006). O genoma do HPV pode ser dividido em

três domínios: uma região não-codificante reguladora (URR- *upstream regulatory region* ou LCR- *long control region*); uma região precoce, que contém 6 ORFs (*E6, E7, E1, E2, E4 e E5*), e uma região tardia que codifica as duas proteínas da cápside, L1 e L2 (Stanley *et al.*, 2007) (Fig. 3). Os genes virais são denominados de precoces (*early, E*) ou tardios (*late, L*), dependendo de quando são expressos durante o ciclo de vida (Ault, 2006).

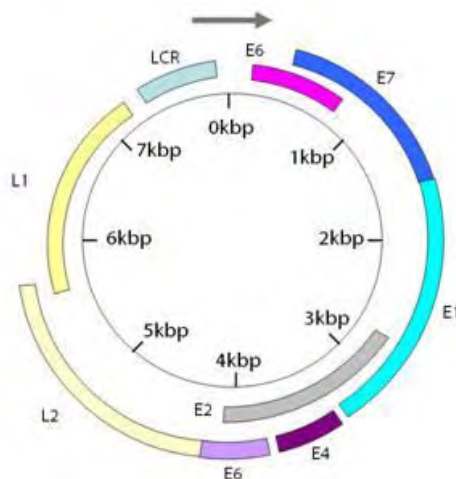


Figura 3. Organização do genoma do HPV. Representação dos genes precoces (*E1, E2, E4, E5, E6 e E7*), dos genes tardios (*L1 e L2*) e da região regulatória (LCR). Adaptado de <http://www.cancer-therapy.org/>.

A região reguladora (URR ou LCR) do HPV não codifica proteínas, mas contém a origem de replicação e a maioria dos promotores de transcrição viral (Rosa *et al.*, 2009). A região precoce codifica proteínas necessárias à replicação do DNA e que estão envolvidas na transformação celular e oncogénese. As E1 e E2 estão envolvidas na replicação do DNA viral. A E1 possui actividade de helicase, ATPase e de ligação ao ATP. A E2 reprime a expressão de E6 e E7 e é necessária para a manutenção do genoma viral em infecções persistentes. A E4 rompe os filamentos de queratina das células, facilitando, deste modo, a libertação de partículas de HPV. A E5 interage com os domínios transmembranares dos receptores do factor de crescimento epidérmico (EGFR), controlando a sua concentração e fosforilação, e inibe as respostas imunológicas do hospedeiro (Nicol *et al.*, 2005). As E6 e E7 estão intimamente relacionadas com a oncogénese, uma vez que são responsáveis por alterações no metabolismo celular do

hospedeiro, através da sua ligação aos produtos dos genes supressores de tumores, *TP53* e *pRb* (Ault, 2006; Herbert & Coffin, 2008; Howley, 2006; Nicol *et al.*, 2005). A região tardia codifica as proteínas estruturais da cápside (L1 e L2) (Herbert & Coffin, 2008; Rosa *et al.*, 2009; Stanley *et al.*, 2007; Waldemar *et al.*, 2006).

Os HPV apresentam tropismo tecidual, o que se deve ao facto de diferentes tipos celulares expressarem receptores específicos (Lorenzi & Coelho-Castelo, 2008; Rosa *et al.*, 2009). O HPV tem preferência para infecções cutâneas ou das mucosas escamosas internas (Stanley *et al.*, 2007).

1.2.3 Infecção por HPV

No tracto genital, o HPV infecta as células basais do epitélio escamoso estratificado e as células metaplásicas da zona de transformação da junção escamo colunar cervical (zona de transformação do colo do útero) (Ault, 2006).

Dependendo do genótipo do HPV e da interacção vírus/hospedeiro, pode haver infecções assintomáticas ou manifestações clínicas na forma de verrugas genitais externas/condilomas (infecção por HPV sem displasia) ou neoplasias intraepiteliais cervicais (Nicol *et al.*, 2005). O período que decorre entre a infecção e o aparecimento de lesões é altamente variável e pode ir de semanas a meses (Stanley *et al.*, 2007). Em aproximadamente 30% dos casos de condiloma observa-se remissão espontânea. As lesões planas, mais comumente encontradas no colo uterino, podem regredir, persistir ou progredir, em baixa percentagem, para carcinoma. Os índices de remissão dependem do tipo e do potencial oncogénico viral. Alguns autores evidenciaram que, 12 meses após o início da infecção, 70% das mulheres já não apresentavam DNA de HPV e que, 24 meses mais tarde, apenas 9% ainda apresentava DNA de HPV no tracto genital inferior. Por sua vez, o risco relativo para cancro é elevado em mulheres com infecções persistentes, principalmente nas infectadas por HPV 16 ou 18 (Herbert & Coffin, 2008; Schlecht *et al.*, 2001; Stanley *et al.*, 2007).

A infecção e a replicação viral dependem inteiramente do programa de diferenciação dos queratinócitos, porque estes processos só ocorrem nas células epiteliais escamosas totalmente diferenciadas, nunca tendo sido detectados nas camadas basais, nem

nos fibroblastos da derme subjacente (Howley, 2006; Pyeon *et al.*, 2009; Stanley *et al.*, 2007).

A infecção inicia-se na camada basal da epiderme, decorrente de micro-abrasões e lesões da pele ou da mucosa (Hsueh, 2009). Após a infecção, o HPV pode permanecer latente na camada basal sem causar qualquer alteração patológica. Quando isso não ocorre, o vírus replica-se na camada proliferativa, onde expressa as suas proteínas precoces (Rosa *et al.*, 2009).

A replicação viral inicia-se então, nas camadas parabasais. Segue-se a expressão dos genes tardios, a qual se processa no núcleo das células superficiais. A replicação vegetativa do DNA (síntese de proteínas da cápside e montagem de partículas virais) só tem lugar nas células mais diferenciadas, os queratinócitos. Os queratinócitos infectados passam a exibir alterações morfológicas típicas, designadas por coilocitose. Os coilócitos são, pois, queratinócitos infectados por HPV e são células moribundas (Rosa *et al.*, 2009).

O tropismo tecidual, as alterações histopatológicas distintas e os tipos de respostas imunológicas do hospedeiro, são dependentes dos diferentes tipos virais. A expressão das proteínas virais é fortemente regulada e dependente da diferenciação celular. No entanto, o mecanismo pelo qual o HPV transforma as células ainda não é completamente compreendido (Stanley *et al.*, 2007).

Nas lesões CIN I e nos condilomas, o vírus penetra nas células basais e o seu genoma encontra-se separado do DNA celular, surgindo como um plasmídeo extra-cromossómico (epissoma circular). Estas lesões, habitualmente causadas por tipos de baixo risco, são geralmente eliminadas espontaneamente (Ault, 2006; Palefsky, 2006; Rosa *et al.*, 2009). Nas lesões intraepiteliais de alto grau (CIN II e CIN III), o DNA de HPV integra-se nos cromossomas da célula hospedeira (Ault, 2006; Rosa *et al.*, 2009). Quando ocorre a integração, ocorre a quebra do genoma viral e a sua linearização. Esta quebra não é aleatória, pois a maioria acontece nas regiões *E1* e *E2* do vírus. O resultado é a perda de função das respectivas proteínas e, consequentemente, a desregulação dos genes *E6* e *E7*, uma vez que a *E2* tem como função reprimir a sua expressão. Esta desregulação contribui para a transformação da célula hospedeira (Howley, 2006; Rosa *et al.*, 2009). Este factor, conjuntamente com outros factores que podem levar a alterações genéticas, bem como os factores de risco já referidos, podem levar à progressão para o carcinoma do colo do útero (Palefsky, 2006) (Fig. 4).

Como referido, as proteínas codificadas pelo genoma do HPV, principalmente a E6 e a E7, estão relacionadas com a carcinogénese mediada pelo HPV, uma vez que interagem com proteínas reguladoras do ciclo celular da célula hospedeira. O ciclo celular é controlado por proto-oncogenes e genes supressores de tumores. A p53 e a pRb, produtos de genes supressores de tumores, são duas proteínas chave no controlo do ciclo celular, na medida em que estão envolvidas em processos como a progressão do ciclo celular, a reparação de DNA, a apoptose, a diferenciação, a senescência e a remodelação da cromatina (Buitrago-Pérez *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2009; Waldemar *et al.*, 2006). A inactivação destas proteínas pode resultar na proliferação das células basais e na alteração do seu programa de diferenciação e, deste modo, permitir a expansão das células epiteliais para a replicação de partículas virais (Rosa *et al.*, 2009). A E6 interage com a proteína p53 e a E7 com a proteína pRb (Soares *et al.*, 2008; Wilting *et al.*, 2009).

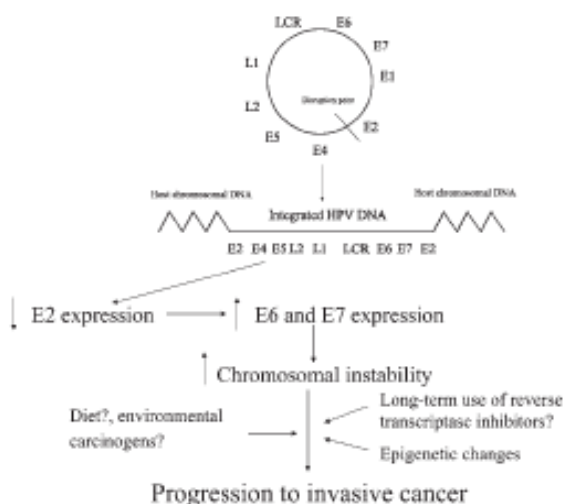


Figura 4. Progressão para cancro do colo do útero. A integração do DNA de HPV no genoma do hospedeiro promove a instabilidade cromossómica e, consequentemente, contribui, juntamente com outros factores (ambientais, genéticos e comportamentais), para a progressão para cancro do colo do útero. Adaptado de (Palefsky, 2006).

A E6 liga-se à proteína p53, através da proteína associada a E6 (E6AP). Na presença da E6, a E6AP catalisa a ubiquitilação e a proteólise da p53, inibindo assim a

sinalização dependente da p53, decorrente de estímulos de stress. Consequentemente, as células epiteliais do hospedeiro infectadas com HPV não são induzidas a entrar em apoptose (Ault, 2006; Buitrago-Pérez *et al.*, 2009; Howley, 2006). A E6AP é uma ligase E3 da ubiquitina. Na ausência da E6, a E6AP não está envolvida na regulação da estabilidade da p53 (Howley, 2006) (Fig. 5). Estudos *in vitro* comprovam que os níveis de p53 nas células infectadas por HPV de alto risco são inferiores a níveis de p53 de células não infectadas. O tempo de semi-vida da p53 também se encontra reduzido em queratinócitos humanos que expressam a proteína E6 (Howley, 2006).

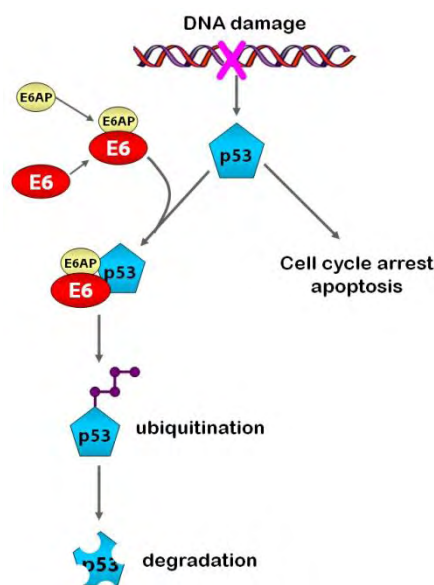


Figura 5. Mecanismos de acção da p53 e a sua degradação através da ubiquitina e via do proteassoma. Danos no DNA induzem a activação da p53, o que pode levar a uma paragem do ciclo celular ou a morte celular programada (apoptose) das células danificadas. Quando a E6 está presente, promove a degradação da p53. A E6 liga-se à p53, através da E6AP, que catalisa a ubiquitilação e a proteólise da p53 no proteassoma. Adaptado de <http://www.cancer-therapy.org/>.

A E7, por sua vez, liga-se à pRb inibindo a sua função. Após associação da E7 com as proteínas da família da pRb (pRb, p107 e p130), a E7 impede a associação destas com os factores de transcrição E2F. Como consequência, é induzida a expressão de proteínas

envolvidas na divisão celular (Buitrago-Pérez *et al.*, 2009). Adicionalmente, a E7, ao ligar-se às pRb, também induz a sua degradação no proteassoma (Buitrago-Pérez *et al.*, 2009). Estas interações levam, assim, a uma disfunção do ciclo celular, à destabilização cromossómica e a inibição dos inibidores de cinases dependentes de ciclinas e de interferons (Ault, 2006).

A integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira é, provavelmente, o passo mais importante na carcinogénese cervical. A combinação da perda da regulação transcricional viral e a activação da transcrição do DNA viral integrado podem levar a uma sobre-expressão de genes essenciais ao desenvolvimento do carcinoma do colo do útero. Alternativamente, a integração do DNA do HPV pode estar associada ou a um proto-oncogene ou a um gene supressor de tumor, o que pode conduzir à ocorrência de transformação maligna, crucial na patogénese do cancro do colo do útero (Herbert & Coffin, 2008; Rosa *et al.*, 2009; Waldemar *et al.*, 2006; Wilting *et al.*, 2009).

1.3 Resposta Anti-viral

1.3.1 Imunidade Inata *versus* Imunidade Adquirida

A maioria dos vírus, incluindo o HPV, infecta os seus hospedeiros através das mucosas, principalmente das vias aéreas, tracto gastrointestinal e tracto uro-genital, sendo estas, as primeiras barreiras contra as infecções. Os ambientes ácidos existentes nas mucosas gástricas e no ambiente vaginal são factores de protecção importantes que actuam como barreiras químicas contra a penetração dos vírus.

O sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra os agentes patogénicos e é capaz, por si só, de resolver algumas das infecções microbianas (Kawai & Akira, 2007). A resposta gerada pelo sistema imunológico inato é inespecífica e é responsável por activar o sistema imunológico adquirido. Este último gera uma resposta específica, mais eficaz, de que resulta memória imunológica (Akira *et al.*, 2006; Bauer *et al.*, 2008; Stanley, 2006).

Após a entrada do HPV nas mucosas cervico-vaginais, o sistema imunológico inato é activado. Um dos mecanismos de defesa do sistema imunológico inato contra os vírus é

constituído pelas defensinas. As defensinas são péptidos catiónicos produzidos por células epiteliais e leucócitos, que interagem com as membranas aniónicas dos microorganismos, permeabilizando-as, através da formação de poros, e causando a lise celular dos mesmos (Lorenzi & Coelho-Castelo, 2008). Na resposta inata contra vírus também é desencadeado um conjunto de acções que culminam na activação de células de defesa como as células NK (*Natural Killer*), na secreção de IFNs do tipo I (α e β) e de outras citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , factor de necrose tumoral- *alpha*) e na activação dos fagócitos locais. A secreção de IFNs é desencadeada pela ligação a receptores tipo-Toll (TLR) de sequências específicas do vírus que desencadeiam a sinalização intracelular. As células NK e os fagócitos são as principais células do sistema imunológico inato utilizadas no controlo de infecções virais. As células dendríticas (DC) são as responsáveis por activar o sistema imunológico adquirido. Após o reconhecimento do agente invasor, as DC migram para os órgãos linfóides secundários onde, após maturação, assumem a função de células apresentadoras de antígeno (APC), que apresentam antígeno aos linfócitos T *naive* e vão, assim, desencadear uma resposta imunológica adquirida (Mota *et al.*, 1999).

Os queratinócitos, células que constituem cerca de 95% do epitélio cervical, podem igualmente funcionar como APC e expressar moléculas do complexo MHC II durante a inflamação e transformação celular, bem como fornecer alguns sinais costimulatórios aos linfócitos T. A função de apresentação antigénica das DC e dos queratinócitos está sob controlo exógeno exercido por alguns mediadores solúveis, nomeadamente o TNF- α e a IL-10, duas citocinas de funções antagonistas. O TNF- α potencia a apresentação antigénica pelas DC. Em contraste, a IL-10 é imunossupressora (Mota *et al.*, 1999). A maturação de APCs e a presença de citocinas no local estabelece assim a ponte entre a imunidade inata e a imunidade adquirida (Stanley, 2006).

Os linfócitos T *helper* ou de ajuda ($CD4^+$) têm um papel central, tanto na imunidade humoral, como na imunidade mediada por células. Estas células reconhecem os antígenos (processados em pequenos péptidos) ligados às proteínas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) classe II (HLADR e -DQ) e apresentados como um complexo receptor-antígeno ligado à membrana da APC (Stanley, 2006). Os linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$) reconhecem antígenos apresentados no contexto de MHC classe I. Os linfócitos T de ajuda são os principais reguladores da resposta imunológica e os linfócitos T citotóxicos são responsáveis pela lise das células infectadas (Stanley *et al.*, 2007). A activação dos

linfócitos T CD4⁺ resulta na secreção de citocinas, que auxiliam e regulam outras células. O padrão da expressão de citocinas define dois grandes subtipos de linfócitos T CD4⁺, conhecidos como Th1 e Th2. Os linfócitos Th1 secretam maioritariamente IFN γ e medeiam a activação de células efectoras citotóxicas (macrófagos, células NK e linfócitos T citotóxicos). Os linfócitos Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-13 e estão envolvidos na resposta humoral (Akira *et al.*, 2006; Stanley, 2006).

As respostas humoral e celular são importantes na prevenção e regressão das lesões por HPV. A imunidade humoral é responsável por eliminar as partículas virais extracelulares e pode prevenir futuras reinfecções. A imunidade mediada por células é essencial para a eliminação de células infectadas por vírus. Ambas geram memória imunológica. De facto, em estudos histopatológicos de lesões causadas por HPV que evoluíram com remissão espontânea, observou-se um intenso infiltrado de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) e macrófagos no epitélio e estroma das verrugas genitais (Frazer, 2009; Nicol *et al.*, 2005; Palefsky, 2006; Stanley, 2006).

Estudos, em mulheres positivas para DNA de HPV, demonstraram que muitas delas deixaram de apresentar o DNA de HPV após os 30 anos de idade (Palefsky, 2006). Tais factos, dever-se-ão provavelmente ao desenvolvimento uma resposta imunológica eficaz e resolução da infecção. Pelo contrário, cerca de 15% das mulheres com infecção genital por HPV de alto risco não conseguiam resolver a infecção. Mota e colaboradores (Mota *et al.*, 1999) ao comparar lesões CIN com amostras normais, sem lesão, verificaram que, nas lesões, a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , se encontrava diminuída, enquanto que a expressão de IL-10 estava aumentada. A resposta local necessária à activação adequada dos linfócitos T seria assim pouco eficaz. Este facto poderia contribuir para a persistência de infecção e para uma eventual progressão para CIN.

Como referido, os mecanismos de defesa envolvidos na regressão das lesões induzidas por HPV envolvem sempre uma resposta imunológica mediada por células, sendo então necessária uma apresentação antigénica adequada aos linfócitos mediada pelas proteínas do complexo MHC. Falhas nestes processos podem ser responsáveis pela susceptibilidade a infecções virais, e deste modo levar à progressão da doença. Têm sido demonstradas associações entre alelos ou haplótipos HLA (*human leucocyte antigens*) e infecção por HPV e cancro do colo do útero (Odunsi *et al.*, 1995; Rosa *et al.*, 2009).

1.3.2 Receptores de Reconhecimento de Padrões: os receptores tipo-Toll

O sistema imunológico inato reconhece características que identificam antígenos estranhos ao organismo e inicia uma resposta apropriada (Akira *et al.*, 2006). Os antígenos estranhos são reconhecidos através de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), que são motivos moleculares partilhados por agentes patogénicos (Bauer *et al.*, 2008).

Os PAMP, estruturas altamente conservadas presentes em diferentes grupos de microorganismos, são detectados por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores tipo-Toll (TLR) (Bauer *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009; Musette *et al.*, 2006; Stanley, 2006; Xagorari & Chlichlia, 2008). Várias classes de PRRs, incluindo os TLRs, reconhecem componentes microbianos distintos e activam directamente as células do sistema imunológico. A exposição destas células aos ligandos dos TLRs leva à activação de cascatas de sinalização intracelular, que rapidamente induzem um aumento da expressão de genes envolvidos na resposta imunológica (Akira *et al.*, 2006; Xagorari & Chlichlia, 2008).

Diferentes PRRs reagem com PAMPs específicos, activando assim vias de sinalização específicas e conduzindo a respostas anti-microbianas distintas (Akira *et al.*, 2006; Kawai & Akira, 2007). As RNA helicases citoplasmáticas são PRRs que reconhecem RNAs de cadeia dupla produzidos durante a replicação viral. Tanto os TLRs como as RNA helicases são expressos em diferentes compartimentos intracelulares e induzem respostas com produção de IFNs do tipo I, através de vias distintas de sinalização celular. Os TLRs têm a função de vigiar o meio extracelular e os compartimentos endossómicos, enquanto que as RNA helicases patrulham o meio citoplasmático para a presença de RNAs virais de cadeia dupla (Xagorari & Chlichlia, 2008).

A descoberta dos TLRs nos mamíferos veio abrir um novo capítulo no reconhecimento viral e na imunidade inata. O reconhecimento viral pelos TLRs estimula a resposta imunológica inata através da activação de vias dependentes e independentes de IFN α/β . A ligação dos TLRs culmina com a síntese de citocinas antivirais, tais como IFNs do tipo I, IL-1 β e IL-6, que podem actuar directamente na replicação viral (Kawai & Akira, 2007). Estes sinais levam também ao recrutamento de células imunológicas para os

locais de infecção e à activação de DC, que, depois, desencadeiam respostas de imunidade adquirida (Zak & Aderem, 2009).

O membro fundador da família dos TLR, denominado de Toll, foi inicialmente identificado como o produto de um gene essencial para o desenvolvimento da polaridade dorso-ventral embrionária em *Drosophila* (Akira *et al.*, 2006; Bauer *et al.*, 2008; Musette *et al.*, 2006; Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2008). Os TLRs são proteínas transmembranares de tipo I, conservadas ao longo da evolução (Bauer *et al.*, 2008; Kawai & Akira, 2007; Musette *et al.*, 2006), que reconhecem vários PAMPs de diferentes origens, tais como bactérias, vírus, fungos ou protozoários (Bauer *et al.*, 2008). Actualmente estão identificados nos mamíferos 12 membros da família dos TLRs (Akira *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2009). A análise filogenética desta família, revela que, nos vertebrados, os TLRs estão divididos em pelo menos seis sub-famílias e em três grandes famílias. As três grandes famílias correspondem ao tipo de ligandos que cada TLR reconhece: ácidos nucleicos, proteínas e lípidos (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2008). Deste modo, a sub-família que engloba os TLR1, 2, 4, 6 e 10 reconhece lípidos, a sub-família dos TLR5 e 11 reconhece proteínas, enquanto que a sub-família dos TLR3, 7, 8, 9 reconhece ácidos nucleicos microbianos (Fig. 7). Contudo, há TLRs que podem reconhecer vários ligandos não relacionados estruturalmente, como é o caso do TLR4 (Akira *et al.*, 2006; Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2008).

Os TLRs são constituídos por domínios extracelulares que contêm repetições ricas em leucina (LRR) e um domínio citoplasmático sinalizador, homólogo do receptor da IL-1 (IL-1R), denominado de TIR (Toll/IL-1R) (Akira *et al.*, 2006; Kawai & Akira, 2005; Takeda & Akira, 2004). Os domínios LRR são compostos por 16-28 motivos, cada um dos quais com 20-30 aminoácidos (Kumar *et al.*, 2009).

Quatro membros da família dos TLRs têm, como o referido anteriormente, um papel importante no reconhecimento de ácidos nucleicos virais: o TLR3 reconhece RNA de cadeia dupla (este tipo de ácidos nucleicos constitui o genoma de uma classe de vírus, mas também é gerado durante o ciclo de vida de vários outros tipos de vírus), os TLR7 e 8 reconhecem RNA de cadeia simples e o TLR9 liga-se a DNA viral de cadeia dupla, pois reconhece domínios virais de CpG não metilados. Os TLR2 e 4 podem também estar envolvidos no reconhecimento de vírus através da detecção de outros componentes virais,

tais como as glicoproteínas do invólucro (Deane & Bolland, 2006; Xagorari & Chlichlia, 2008).

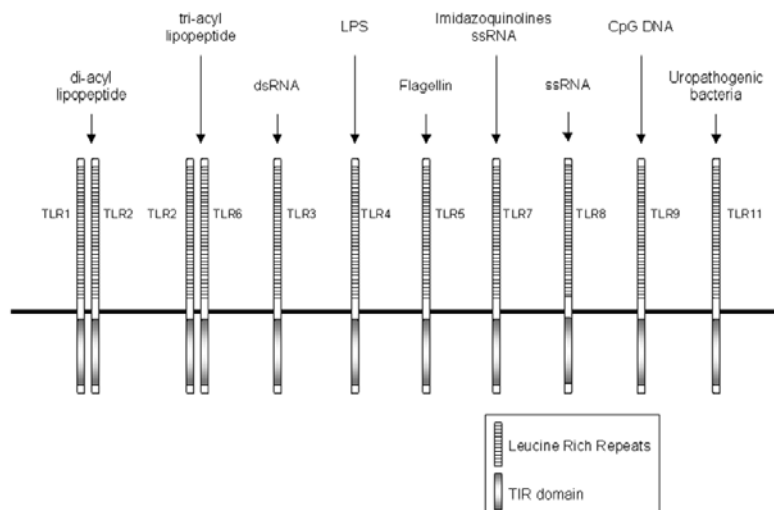


Figura 6. Estrutura e ligandos para os TLRs. Estão representados os dois domínios do TLRs, o domínio extracelular, constituído por LRR, e o domínio citoplasmático, que contém o TIR. Estão assinalados os ligandos de cada TLR. De destacar os TLR3, 7, 8, 9 especializados no reconhecimento de vírus. Adaptado de (Kawai & Akira, 2005).

Os TLRs são expressos por vários tipos de células imunológicas, incluindo macrófagos, células dendríticas e linfócitos T, bem como por outros tipos de células, tais como os fibroblastos e as células epiteliais (Akira *et al.*, 2006; Bauer *et al.*, 2008; Musette *et al.*, 2006). A expressão dos TLRs é variável, dependendo da exposição a agentes patogénicos, a citocinas e a stress ambiental. Os TLRs podem ser expressos ao nível da membrana celular ou intracelularmente. Enquanto determinados TLRs (TLR1, 2, 4, 5 e 6) estão presentes na superfície celular, outros (TLR3, 7, 8 e 9) são encontrados quase exclusivamente em compartimentos intracelulares, tais como os endossomas. Nestes últimos, os ligandos dos TLRs, maioritariamente ácidos nucleicos, requerem internalização para o endossoma de modo a que ocorra a sinalização. As regiões próximas da membrana e transmembranares são importantes para a compartimentalização destes receptores (Akira *et al.*, 2006).

1.3.3 Vias de Sinalização dos receptores tipo-Toll

Os TLRs activam as mesmas moléculas de sinalização que são usadas pelo IL-1R. A activação de células via TLR, leva ao recrutamento de proteínas adaptadoras que contêm o domínio TIR, tal como o factor de diferenciação mielóide 88 (MyD88), para a porção citoplasmática dos TLRs, através de interacções homofílicas entre os domínios TIR (Kawai & Akira, 2005). Após a ligação dos respectivos ligandos, os TLRs formam homo ou heterodímeros e sofrem alterações conformacionais necessárias para o recrutamento do domínio TIR (Kawai & Akira, 2005; Kumar *et al.*, 2009; Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2008; Takeda & Akira, 2004).

Estão identificadas quatro moléculas adaptadoras: MyD88; TIRAP/MAL (proteína adaptadora com domínio TIR/ adaptador tipo MyD88); TRIF/TICAM1 (adaptador com domínio TIR, indutor do IFN β / molécula adaptadora 1 de TLR) e TRAM (molécula adaptadora relacionada com TRIF) (Akira *et al.*, 2006; Kawai & Akira, 2007; Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2008). A descoberta de quatro tipos de adaptadores que contêm o domínio TIR veio revelar que há diferenças nas vias de transdução de sinal de cada um dos TLRs. Estas diferenças podem ser responsáveis pela indução de diferentes respostas efectoras, através do uso selectivo destas moléculas adaptadoras, bem como de respostas redundantes que são conservadas em todos os tipos de TLRs (Kawai & Akira, 2005; Takeda & Akira, 2004). O MyD88 e o TRIF são os adaptadores responsáveis pela activação de vias de sinalização que levam à produção de citocinas pró-inflamatórias e de IFNs do tipo I, respectivamente (Fig 8) (Akira *et al.*, 2006; Kawai & Akira, 2007; Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2008).

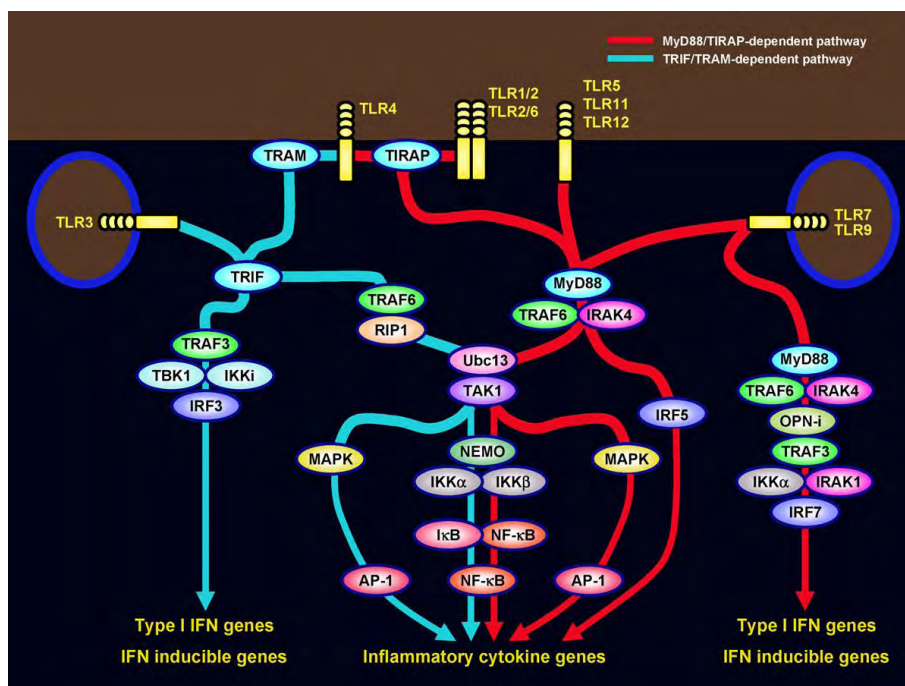


Figura 7. Sinalização dos TLRs em APC. No decorrer das vias de sinalização, o NF-κB e os IRF são translocados para o núcleo. O NF-κB promove o início da transcrição de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, enquanto os IRFs promovem a transcrição de genes que codificam IFNs do tipo 1 e genes indutores de interferons. Adaptado de (Kawai & Akira, 2007).

1.3.4 TLR7

Como já referido anteriormente, o TLR7 liga-se a RNA viral de cadeia simples. Apesar de o HPV ser um vírus de DNA, este TLR, bem como o TLR8 e 9, é muito importante para o reconhecimento, uma vez que todos os vírus de DNA, produzem RNA de cadeia simples durante o seu ciclo de vida (Lorenzi & Coelho-Castelo, 2008). Estudos efectuados em ratinhos deficientes em TLR7 demonstraram que vírus de RNA de cadeia simples (vírus da estomatite vesicular e vírus influenza) necessitavam do TLR7 para desencadearem respostas com produção de IFNs do tipo I. A activação de células através do TLR7 induz a produção de IFNs do tipo I pelas células infectadas, nomeadamente DC. O TLR7 é expresso em níveis elevados em DC plasmocitóides (pDC) (Akira *et al.*, 2006; Crozat & Beutler, 2004; Musette *et al.*, 2006).

A dependência do MyD88 na sinalização via TLR7 foi comprovada em estudos usando ratinhos deficientes em MyD88. Verificou-se que a produção de citocinas inflamatórias era praticamente nula quando estes animais eram expostos a ligandos específicos (Crozat & Beutler, 2004; Kawai & Akira, 2005; Takeda & Akira, 2004; Xagorari & Chlichlia, 2008; Yang *et al.*, 2005). Por outro lado, estudos efectuados em ratinhos deficientes nos adaptadores TRAM e TIRAP/MAL, utilizando ligandos do TLR7, demonstraram que as respostas se mantinham intactas relativamente à produção de citocinas inflamatórias. Estas evidências vieram confirmar que a activação da via dependente de MyD88 é necessária para a indução de respostas inflamatórias mediadas pelo TLR7 (Akira & Hoshino, 2003; Kawai & Akira, 2005; Takeda & Akira, 2004). A interacção entre os RNAs virais de cadeia simples e o TLR7 desencadeiam o recrutamento da molécula adaptadora MyD88 e a activação do NF- κ B, bem como de outros factores de transcrição que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimioquinas (Fig. 8) (Deane & Bolland, 2006; Kawai & Akira, 2005).

Estão actualmente descritas duas vias de reconhecimento de RNA viral: a via exógena e a via endógena. Através da via exógena, após digestão do invólucro viral, ou das proteínas da cápside, pelas enzimas da célula hospedeira, o RNA é internalizado sob a forma de viriões e é detectado pelo TLR7 nos endossomas. Na via endógena, as pDC ao reconhecerem o vírus e após a sua internalização transferem, por autofagia, o RNA viral do citoplasma para os compartimentos endossómicos, onde se encontra o TLR7. Independentemente da forma de internalização do RNA de cadeia simples (fusão com a membrana plasmática ou fusão com a membrana do endossoma), a sua detecção pelo TLR7 ocorre sempre no endossoma (Xagorari & Chlichlia, 2008).

Verificou-se que algumas substâncias sintéticas podiam funcionar como agonistas do TLR7. Este é o caso da imidazoquinolina (Imiquimod®) (Musette *et al.*, 2006), um componente antiviral que induz a produção de IFNs do tipo I e IL-12 por células imunológicas (Bauer *et al.*, 2008; Smits *et al.*, 2008); e dos análogos de guanosina, tal como a loxorribina (Kumar *et al.*, 2009). A administração local de estímulos pró-inflamatórios, tais como o IFN α e agonistas do TLR7 (imiquimod), induzem uma resposta antiviral *in vivo* (Crozat & Beutler, 2004; Xagorari & Chlichlia, 2008). Este tipo de tratamento apresenta uma eficácia comprovada no tratamento de verrugas genitais (Bauer *et al.*, 2008; Frazer, 2009). Estudos efectuados em animais provam que análogos sintéticos

de nucleósidos, ligandos dos TLR7 e 8, podem vir a ser usados futuramente para modular respostas imunológicas no combate a infecções virais ou tumores em humanos (Bauer *et al.*, 2008; Smits *et al.*, 2008).

1.3.5 Mecanismos de evasão imunitária do HPV

Para garantir a sua sobrevivência, o HPV tem de escapar ao sistema imunológico do hospedeiro (Lorenzi & Coelho-Castelo, 2008; Stanley, 2006; Stanley *et al.*, 2007; Xagorari & Chlichlia, 2008). O HPV, tal como outros vírus, exerce uma resposta contra o sistema imunológico do hospedeiro, através de mecanismos que bloqueiam o seu reconhecimento e consequentemente a sinalização celular, e que envolvem a expressão de proteínas virais que inibem moléculas importantes nas cascatas de sinalização resultantes da activação dos PRRs (TLRs e RNA helicases) (Xagorari & Chlichlia, 2008). Assim, o HPV pode inibir a síntese e a sinalização dos IFNs. Os IFNs do tipo 1, IFN α e IFN β , apresentam propriedades anti-virais, anti-proliferativas, anti-angiogénicas e imuno-estimulatórias e actuam como uma ponte entre a imunidade inata e a adquirida, activando as DC imaturas. Uma infecção por HPV de alto risco diminui a expressão do gene que codifica o IFN α e, as oncoproteínas E6 e E7, do HPV 16, interagem directamente com componentes das vias de sinalização dos IFNs (Frazer, 2009; Nicol *et al.*, 2005; Stanley, 2006; Stanley *et al.*, 2007). Por exemplo, foi demonstrado que o HPV 16 altera a expressão de três grupos de genes: genes responsivos a IFNs, genes-alvo do NF- κ B e genes de regulação do ciclo celular (Akira *et al.*, 2006; Frazer, 2009; Nicol *et al.*, 2005; Stanley, 2006).

Estes mecanismos não passam de estratégias virais utilizadas pelo HPV para resistir às respostas imunológicas do hospedeiro e, assim, permitir a sua presença durante longos períodos de tempo. Estas estratégias resultam, por vezes, em infecções crónicas persistentes (Lorenzi & Coelho-Castelo, 2008; Stanley *et al.*, 2007).

1.4 Métodos Biomoleculares utilizados no estudo do *TLR7*

1.4.1 O gene *TLR7*

O *TLR7* apresenta elevada homologia com o *TLR8* e está localizado no cromossoma X, na região Xp22.3 (Akira *et al.*, 2006; Musette *et al.*, 2006). Este gene possui 3 exões e 2 intrões, 23278 pares de bases e codifica uma proteína com 1049 aminoácidos (www.ncbi.nlm.nih.gov/). A região codificante deste gene encontra-se nos exões 2 e 3. Não se encontram descritas mutações neste gene, mas 240 polimorfismos já estão descritos ao longo dos 23278 nucleótidos constituintes do *TLR7*.

Neste trabalho foram estudadas a região codificante, as UTRs (*untranslated region*) e as zonas de *splicing*. Para tal foram utilizados os seguintes métodos biomoleculares: reacção em cadeia da polimerase (PCR), *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) e sequenciação automática de DNA.

1.4.2 Reacção em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR)

Em 1984, um grupo de cientistas desenvolveu um procedimento para obter uma grande quantidade de cópias de fragmentos de DNA em poucas horas, que denominaram de reacção em cadeia da polimerase (PCR) (Buitrago & Jimenez, 2001). Esta técnica veio possibilitar novas estratégias de análise de genes.

O fundamento desta técnica baseia-se nos princípios naturais da replicação de DNA. A replicação do DNA, essencial à continuidade da vida dos organismos, é simulada através da técnica de PCR, que utiliza os princípios da replicação natural para obter uma grande quantidade de cópias de fragmentos de DNA. A replicação do DNA é denominada de replicação semi-conservativa porque durante a formação de uma nova cadeia nucleotídica tem-se como referência uma única cadeia nucleotídica molde (ou mãe) do DNA que está a ser replicado. Para que o processo de replicação se inicie é necessária a actuação da enzima DNA helicase que se liga à cadeia de DNA e desliza sobre ela, quebrando as ligações entre as duas cadeias (pontes de hidrogénio). As duas cadeias de DNA ficam então separadas. Em seguida, após a ligação de *primers* às cadeias simples de

DNA, dá-se o início da replicação, através da DNA polimerase, que necessita de uma extremidade 3'OH livre para iniciar a síntese de DNA. Os nucleotídeos livres existentes no núcleo vão ligar-se, por complementaridade de bases, às cadeias de DNA, mediante a acção da DNA polimerase que polimeriza a partir da origem de replicação. A partir de uma cadeia original de DNA formam-se assim duas novas cadeias (Videira, 2001).

A PCR traduz-se então na repetição cíclica de três reacções simples, que variam apenas na temperatura de incubação. Deste modo, são necessários os seguintes componentes numa técnica de PCR: DNA polimerase, desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, e dTTP), dois *primers* que delimitam a sequência alvo a amplificar, denominados de *primer forward* e *primer reverse*; solução tampão que fornece as condições de pH e salinidade para que ocorra síntese; iões Mg^{2+} (cofactores necessários à actividade da Taq polimerase) e o DNA alvo que inclua a sequência que se quer amplificar (Guo *et al.*, 2008; Strachan & Read, 2002). Na técnica original, utilizava-se, como DNA polimerase, o fragmento de *Klenow* da DNA polimerase da *Escherichia coli*. Esta enzima é inactivada nas altas temperaturas utilizadas para desnaturar o DNA, pelo que tinha de ser adicionada em cada ciclo após a desnaturação. Posteriormente, começou-se a utilizar a DNA polimerase da *Thermus aquaticus*, também conhecida por Taq polimerase. Esta enzima apresenta elevada resistência ao calor, pelo que veio resolver a condicionante anterior. Para além disso, apresenta maior especificidade do que a DNA polimerase da *E. coli* (Buitrago & Jimenez, 2001).

A técnica de PCR inclui, então, um primeiro passo que consiste na desnaturação do DNA a temperaturas elevadas, com vista a obter duas cadeias simples de DNA. De seguida, o segundo passo é realizado a temperaturas mais baixas, e consiste na ligação dos oligonucleótidos (*primers*) de forma a que fiquem a delimitar a zona que se quer amplificar. Esta fase é denominada de *annealing*. Os dois *primers* não devem ser complementares entre si, de modo a não emparelharem entre si, e os seus locais de hibridação não devem ser muito próximos, de modo a que seja possível a síntese de novos produtos (Videira, 2001). A especificidade desta fase de hibridação depende dos *primers* utilizados (que não devem ser muito pequenos; aproximadamente 20pb), das temperaturas utilizadas (os *primers* possuem temperaturas óptimas de hibridação, e a sua ligação deve ser o mais específica possível para não hibridarem com regiões semelhantes e originarem produtos inespecíficos). Por fim, o terceiro passo inclui a síntese de DNA pela Taq

polimerase que faz o alongamento dos *primers*, usando como molde a cadeia com que cada *primer* está emparelhado. Cada um dos *primers*, assim como os quatro desoxirribonucleósidos trifosfatos, devem encontrar-se inicialmente em quantidades elevadas em relação à quantidade de DNA, uma vez que os *primers* são necessários para iniciar as novas cadeias de DNA e os desoxirribonucleósidos trifosfatos para a sua síntese (Buitrago & Jimenez, 2001).

Os ciclos de desnaturação (95°C), emparelhamento (temperatura dependente dos *primers*) e síntese (72°C) são assim repetidos várias vezes no termociclador, sem intervenção manual. Só ao fim do terceiro ciclo de PCR se obtêm moléculas de DNA em cadeia dupla cujas extremidades são definidas pelas extremidades 5' dos *primers* utilizados. Durante cada ciclo posterior de PCR, estas moléculas são duplicadas levando a um crescimento exponencial do fragmento amplificado. Cada n ciclos leva à produção de 2^n moléculas de DNA (Strachan & Read, 2002).

Os principais parâmetros que afectam o funcionamento da PCR incluem a temperatura, os tempos das reacções e as concentrações da DNA polimerase, dos *primers*, do magnésio (Mg^{2+}) e dos desoxirribonucleósidos trifosfato. Relativamente à temperatura, quanto maior a temperatura de *annealing* do *primer*, maior será a sua especificidade; a temperatura de desnaturação deve ser suficientemente elevada para desnaturar o DNA molde sem inactivar a polimerase. Os *primers* “óptimos” podem determinar-se empiricamente ou através de ferramentas bioinformáticas. Sempre que haja necessidade de desenvolver e utilizar *primers*, devem ter-se em conta os seguintes aspectos: 1) os *primers* devem ser complementares em regiões livres de possíveis estruturas secundárias; 2) o seu conteúdo de guanina-citosina deve ser no mínimo 50% do total (uma vez que estabelecem ligações triplas e tornam a ligação do *primer* à cadeia-alvo mais estável e resistente), já que *primers* com baixo conteúdo de guanina-citosina possuem uma temperatura de *annealing* menor, o que pode resultar numa amplificação menos específica; 3) na execução da técnica deve colocar-se uma concentração adequada de *primers*, uma vez que, quando em excesso, amplificam produtos não desejados e 4) os *primers* devem ser específicos das sequências a amplificar. Esta especificidade comprova-se comparando-os com sequências conhecidas disponíveis em bases de dados.

Como referido, o processo de amplificação por PCR gera um crescimento exponencial do produto amplificado. No entanto, há uma fase em que este crescimento

estabiliza e entra numa fase quase linear, alcançando um nível estável. Este efeito, denominado de *plateau*, ocorre quando há atenuação da taxa de acumulação exponencial do produto de PCR que se observa nos últimos ciclos de PCR com a acumulação de uma concentração de produto em redor de 10^{-8} M. Vários factores são responsáveis por este efeito, nomeadamente a inactivação térmica da Taq polimerase, a redução da eficácia da desnaturação ao longo dos ciclos e o *annealing* não eficiente dos *primers* ao longo dos ciclos. Este efeito é portanto inevitável e constitui uma das limitações da técnica. Outra limitação da PCR refere-se à Taq polimerase que não possui a capacidade de correcção de erros e que pode introduzir erros durante a síntese de DNA (Buitrago & Jimenez, 2001).

A técnica de PCR apresenta imensas vantagens tais como: a sua automatização que permite uma amplificação fácil, muito rápida e selectiva de fragmentos de DNA específicos; o DNA a utilizar não ter de ser purificado; e as proteínas contaminantes, que possam existir, serem inactivadas no processo inicial de desnaturação (Videira, 2001). Uma vez que a técnica de PCR é bastante sensível, há que ter muitos cuidados aquando da sua execução, uma vez que é muito vulnerável a contaminações. Também devem ser separadas fisicamente as zonas do laboratório onde se realizam as reacções de PCR daquelas onde se analisam os produtos de PCR, ou, em alternativa, recorrer ao uso de câmaras de fluxo laminar para efectuar as misturas de reacção (com excepção do DNA). Relativamente ao material usado, deve-se ter enorme cuidado relativamente às pipetas, pontas e reagentes utilizados nestas reacções, bem como com os aerossóis, de modo a evitar possíveis contaminações (Strachan & Read, 2002).

As técnicas de PCR têm tido um desenvolvimento notável, e as limitações referidas encontram-se cada vez mais diminuídas. Os melhoramentos introduzidos resultam não só da existência de novos equipamentos, mas também do uso de novas polimerases mais fiáveis que introduzem menos “erros” no DNA (Videira, 2001).

1.4.3 Polimorfismo conformacional de cadeia simples (*Single Strand Conformation Polymorphism*, SSCP)

Esta técnica foi descrita por Orita e colaboradores em 1989 (Orita *et al.*, 1989). A detecção de alterações genéticas por análise de polimorfismos conformacionais do DNA

em cadeia simples (SSCP) baseia-se nas diferenças de conformação que fragmentos de DNA de cadeia simples, após desnaturação, adquirem devido à substituição de um ou mais nucleótidos. O DNA de cadeia simples tem tendência para dobrar-se sobre si mesmo e formar estruturas complexas, estabilizadas por ligações intramoleculares fracas, especialmente pontes de hidrogénio. A mobilidade electroforética dessas estruturas em geles dependerá, então, não só do comprimento das suas cadeias, mas também das conformações que estas adquirem e que dependem da sequência de bases (Buitrago & Jimenez, 2001).

Assim, os produtos de PCR, depois de desnaturação por exposição a temperaturas elevadas são colocados de imediato em gelo, para impedir a sua renaturação. De seguida, são sujeitos a uma electroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante. Durante a electroforese vertical, os fragmentos de DNA de cadeia simples adquirem diferentes estruturas conformacionais, o que faz com que migrem de forma diferente no gel. A separação electroforética dos fragmentos depende, assim, da sequência de bases dos fragmentos de DNA de cadeia simples. Se alguma alteração estiver presente, após desnaturação, as cadeias simples adoptam estruturas tridimensionais diferentes e adquirem mobilidades electroforéticas diferentes (Strachan & Read, 2002). Os padrões de migração no gel de SSCP são visualizados por coloração do DNA pelo nitrato de prata.

A simplicidade e sensibilidade desta técnica permitem analisar um grande número de amostras. Esta técnica é também bastante útil na análise e detecção de polimorfismos já conhecidos, por comparação de padrões de migração já conhecidos (amostras de controlo). Esta técnica possibilita a detecção de cerca de 70-95% de todas as alterações, embora as bandas electroforéticas não permitam por si só revelar a natureza ou a posição de qualquer mutação detectada. A reprodutibilidade também é uma característica muito vantajosa desta técnica (Videira, 2001).

Como desvantagem, é de referir os tamanhos dos produtos de PCR, uma vez que estes devem estar compreendidos entre 150-300pb. O longo tempo de execução (preparação dos geles, preparação das amostras, electroforese durante várias horas e coloração dos geles) e a sua sensibilidade a alterações de temperatura são condicionantes a ter em conta quando se procuram alterações não conhecidas. Há que ter igualmente em conta, a margem de baixa sensibilidade da técnica SSCP a alterações (5-30%). Deste

modo, deve-se complementar a análise dos resultados com outra técnica (Buitrago & Jimenez, 2001).

As principais aplicações incluem a detecção de polimorfismos e de mutações pontuais numa grande variedade de posições nos fragmentos de DNA (Buitrago & Jimenez, 2001).

1.4.4 Sequenciação automática de DNA

O desenvolvimento de métodos de sequenciação nos anos 70 representou um avanço importante nos estudos de DNA. A técnica de sequenciação, processo rápido e automatizado, permite determinar os nucleótidos que compõem a sequência de um fragmento de DNA e representa um dos processos finais na análise de DNA (Buitrago & Jimenez, 2001).

A sequenciação de DNA é o método que permite determinar inequivocamente a localização e a natureza de qualquer mutação. Este método funciona sobretudo para confirmar e localizar mutações identificadas por métodos de rastreio (ex: SSCP) utilizados para detectar mutações pontuais desconhecidas, não sendo, na maioria das vezes, utilizado para detectar mutações, mas sim para as identificar (Strachan & Read, 2002).

A sequenciação torna-se um método caro, sobretudo quando utilizada para estudar exões completos de um gene, em muitas amostras. A análise dos resultados requer alguma disponibilidade de tempo e, deve ser feita por pessoal treinado, especialmente se a matriz de sequenciação não for de boa qualidade e estiverem presentes artefactos (Strachan & Read, 2002).

Os métodos de sequenciação mais utilizados são o de Maxam-Gilbert e o de Sanger-Coulson. Embora o primeiro tenha tido uma ampla utilização inicialmente, o segundo método é mais reprodutível. Daí a sua maior utilização ao longo dos anos. Actualmente, as técnicas de sequenciação ainda utilizam o princípio básico deste método (Buitrago & Jimenez, 2001).

O método de Maxam-Gilbert, denominado também de método de ruptura química, baseia-se na ruptura específica da molécula de DNA marcada em pontos específicos. Para a realização desta técnica, o DNA alvo tem de ser marcado com o composto radioactivo

³²P. Este composto é adicionado a uma das extremidades do DNA (5' ou 3'). Como este método tem por base a decomposição química da molécula de DNA a sequenciar em pontos específicos, o tratamento químico causa a clivagem de forma específica em G, C, G+A e T+C. Cada reacção ocorre em tubos diferentes, de maneira, que após a reacção química, sejam produzidos fragmentos de diferentes tamanhos, todos marcados na extremidade 5'. Os fragmentos marcados, resultantes das quatro reacções, separam-se em quatro poços numa electroforese em gel de poliacrilamida, de acordo com o seu tamanho, em bandas que diferem apenas num nucleótido. As bandas resultantes revelam-se por autorradiografia. A disposição das bandas revela a ordem dos nucleótidos do fragmento de DNA a sequenciar (Buitrago & Jimenez, 2001).

O método de Sanger, ou método de terminação de cadeia, é o método de sequenciação mais comum e envolve a síntese *de novo* de uma série de cadeias simples de DNA, usando como molde a cadeia de DNA que se quer sequenciar. As cadeias sintetizadas são terminadas prematuramente nos vários tamanhos possíveis. A síntese começa no local de ligação do *primer* e termina por incorporação de nucleótidos terminadores (didesoxinucleótidos), que não possuem o grupo hidroxilo na posição 3' da desoxirribose, impedindo assim o estabelecimento de ligações fosfodiéster, o que, consequentemente, termina a incorporação de nucleótidos à cadeia de DNA que está a ser sintetizada. Na sua forma clássica, após a marcação radioactiva do DNA, eram adicionados às quatro reacções de síntese, correspondentes aos quatro nucleótidos possíveis no DNA, didesoxirribonucleótidos trifosfatos (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP). Após desnaturação do fragmento de DNA, ocorre o emparelhamento do *primer* e a DNA polimerase é utilizada para sintetizar DNA a partir do molde. Quando um dos nucleótidos terminadores é incorporado, em vez do nucleótido normal, termina a síntese da cadeia. Os produtos resultantes das quatro reacções são colocados em quatro poços adjacentes num gel de poliacrilamida, separados por electroforese (em condições desnaturantes), e visualizados por exposição do gel a uma película de raios X. A leitura do gel permite deduzir a sequência do fragmento de DNA. Proceder de igual forma, mas com um *primer* que emparelhe na outra extremidade e na outra cadeia, permite determinar a sequência de ambas as cadeias e evitar erros de sequenciação resultantes de artefactos, tais como terminações não específicas ou uma separação electroforética deficiente de algumas sequências (Buitrago & Jimenez, 2001; Videira, 2001).

O desenvolvimento da sequenciação automática, veio solucionar grande parte das limitações apresentadas pelo método de Sanger. No entanto, esta ainda se baseia no princípio básico do método de Sanger e utiliza ddNTPs (didesoxinucleótidos trifosfato) terminais de reacção marcados com fluorescência, o que evita a utilização de compostos radioactivos. Cada ddNTP fluorescente constitui aproximadamente 1% da mistura de dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato). As reacções de polimerização produzem uma mistura de produtos fluorescentes de vários tamanhos que podem ser separados em gel de poliacrilamida ou por electroinjecção com electroforese capilar (Strachan & Read, 2002).

O maior avanço conseguido na técnica automática é a utilização do laser e programas informáticos específicos. Cada ddNTP marcado com fluorescência, quando excitado pelo laser, emite fluorescência em comprimentos de onda específicos para cada tipo de base associada. Assim, os quatro ddNTPs podem ser misturados na mesma reacção e o equipamento detecta o sinal que é depois analisado por programas específicos de bioinformática, com obtenção da sequência de DNA. Nos sequenciadores mais modernos, a electroforese ocorre no interior de microcapilares preenchidos com uma matriz linear de poliacrilamida e quando os fragmentos de DNA atingem a janela de detecção no capilar, um laser excita os corantes fluorescentes. As emissões provenientes dos diferentes fluoróforos, cada uma com um comprimento de onda diferente, resultam em diferentes espectros, que são interpretados pelo software de sequenciação e traduzidos num electroferograma com quatro cores específicas para cada base. Por convenção a base Adenina corresponde à cor verde, Citosina à azul, Guanina ao preto e Timina ao vermelho (Buitrago & Jimenez, 2001; Strachan & Read, 2002; Videira, 2001).

Capítulo 2

Objetivos

2. Objectivos

O objectivo geral deste trabalho foi tentar determinar se alterações genéticas no *TLR7* actuariam como factores de risco, ou de protecção, para infecção por HPV e/ou desenvolvimento de cancro do colo do útero. Neste sentido fomos:

1. Pesquisar alterações no *TLR7* em mulheres com e sem infecção por HPV, em lesões distintas do colo do útero e em mulheres sem lesão. As amostras usadas, anonimizadas, foram obtidas de doentes acompanhadas no Instituto Português de Oncologia de Coimbra de Francisco Gentil, EPE (IPOCFG, EPE).
2. Investigar se as possíveis alterações encontradas poderiam condicionar a infecção por HPV e o desenvolvimento de cancro do colo do útero.

Capítulo 3

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1 Sujeitos

Neste trabalho foram utilizadas amostras de indivíduos do sexo feminino, obtidas a partir de citologias armazenadas em meio líquido, cedidas pelo Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E (IPOCFG, E.P.E).

As amostras foram previamente tipificadas no Laboratório de Patologia Molecular do IPOCFG, E.P.E e agrupadas segundo a lesão (sistema de Bethesda): ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado), lesões de baixo grau (LBG), lesões de alto grau (LAG), carcinomas e amostras de controlo, que incluíam citologias normais de mulheres sem qualquer história de lesão do colo do útero. As idades das mulheres que participaram neste estudo estavam compreendidas entre os 16 e os 80 anos, o que corresponde a uma média de 46 anos.

No quadro 1 consta o número de amostras estudadas por lesão (1).

Quadro 1. Número de amostras estudadas por tipo de lesão.

<i>Tipo de Lesão</i>	<i>Número de Amostras</i>
ASCUS	8
LBG	23
LAG	11
Carcinoma	24
Controlo	40
Total	106

3.2 Extracção de DNA

3.2.1 Colheita do material

As citologias do colo do útero, previamente colhidas e armazenadas em meio líquido PreservCyt (Cytoc Corporation, Boxborough, MA, USA), foram centrifugadas a 4500 rpm durante 15 minutos para obtenção do *pellet* celular que foi posteriormente sujeito a digestão enzimática.

3.2.2 Digestão celular

As amostras foram ressuspensas em 3 ml de tampão de digestão (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, SDS 0,5% e NaCl 0,3 M) e proteinase K (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) a uma concentração final de 0.5 mg/ml. Foi feita uma digestão *overnight* (O/N) a 56°C.

3.2.3 Extracção de DNA usando fenol/clorofórmio

O DNA foi purificado pelo método de fenol/clorofórmio. Adicionou-se fenol:clorofórmio:ácido isoamílico (25:24:1) numa proporção de 1:1 e agitaram-se os tubos, por inversão, até à formação de uma emulsão branca. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 15 min a 4000 rpm, para a separação de diferentes fases: uma fase orgânica inferior, constituída por fenol e clorofórmio; uma interface, constituída por proteína precipitada; e uma fase aquosa superior, contendo os ácidos nucleicos. A fase aquosa foi cuidadosamente removida para um novo tubo, ao qual se adicionou 1 volume de fenol:clorofórmio. Este procedimento foi efectuado até que a interface se apresentasse transparente, sem proteína. Por fim, adicionou-se 1 volume de clorofórmio, centrifugou-se e recolheu-se a fase aquosa para um tubo novo.

3.2.4 Precipitação de DNA

Adicionou-se à fase aquosa 1/10 de volume de acetato de sódio (3M, pH 5,2) e duas vezes o volume de etanol frio a 99%. Deixou-se o DNA a precipitar durante pelo menos 1-2h a -20°C e centrifugou-se a 4000 rpm, a 4°C, durante 10 min. O sobrenadante foi removido com cuidado para evitar a remoção do DNA e este foi lavado com 3ml de etanol a 70% frio. Foi feita nova centrifugação a 4000 rpm durante 15 min. Por fim, deixou-se secar o DNA à temperatura ambiente. Este foi depois ressuspenso em 100µl de água ultra-pura e armazenado a -20°C.

3.3 Detecção de HPV

O DNA de HPV foi amplificado pela técnica de PCR usando os *primers* de consenso degenerados My09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC- 3') e My11 (5' - GCMCAGGGWCATAAYAATGG- 3'), que amplificam uma região de 449-458 pares de bases (dependendo do tipo de HPV) da região conservada L1 (Nobre *et al.*, 2008). A partir de 1µl de DNA genómico amplificou-se o fragmento contendo a região de interesse. As reacções foram realizadas numa câmara de fluxo laminar, de forma a evitar a contaminação das amostras. Foi usado um controlo negativo, contendo todos os reagentes de PCR, excepto DNA, de maneira a monitorizar possíveis contaminações. Uma reacção típica para detecção do genoma viral realiza-se num volume total de 50µl com 100ng de DNA genómico obtido a partir das amostras citológicas e com os seguintes componentes: tampão Taq polimerase 1x (NH₄)SO₄ sem MgCl₂ (Fermentas), 1,5 mM MgCl₂ (Fermentas), 0,2 mM desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (100mM) (Bioron), 0,2 µM de *primers forward* e *reverse* (Eurofins MWG Operon), e 2,5 U da enzima *Taq* polimerase (Fermentas). As amostras foram amplificadas com diferentes quantidades de DNA (0,5, 1 e 2 µl).

O protocolo de amplificação envolveu um passo inicial de desnaturação a 94°C durante 4 min, seguido de 40 ciclos com três passos cada um: desnaturação a 94°C, durante 30 segundos; emparelhamento dos *primers* com o DNA a 56°C, durante 30 segundos; extensão a 72°C, durante 45 segundos. Foi feita uma extensão final a 72°C, durante 8 min. Após cada PCR, de forma a verificar a eficiência da amplificação e a ausência de produtos

inespecíficos, o DNA amplificado foi analisado por electroforese horizontal em gel de agarose (Bioline) a 2%, previamente corado com o corante *GelStar* (Cambrex). Carregou-se o gel com 3µl de produto de PCR juntamente com o tampão de amostra (50% de glicerol, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno de cianol) e deixou-se correr, a 90 V, durante 20min. O tamanho dos fragmentos de PCR foi posteriormente confirmado por comparação com um padrão de pesos moleculares de DNA de 100pb (Invitrogen) através da visualização num transiluminador de luz ultravioleta.

3.4 Pesquisa de alterações no gene *TLR7*

3.4.1 Amplificação por PCR

Para pesquisar alterações no *TLR7* foram amplificadas a região codificante, as zonas de *splicing* e as UTRs. O gene foi dividido em 20 fragmentos, o que teve como objectivo possibilitar a pesquisa de alterações genéticas por SSCP (150-300pb) (Quadro 2). Os *primers* foram desenhados com recurso a ferramentas bioinformáticas (<http://frodo.wi.mit.edu/>).

Na reacção de amplificação, para um volume total de 50µl, com 100ng de DNA genómico das amostras citológicas, foram usados os seguintes componentes: 1x Taq buffer (MBI Fermentas), 1,5mM MgCl₂, 200µM dNTPs (Bioron), 10pmoles dos *primers forward e reverse* (Eurofins MWG Operon) e 2U Taq polimerase (5 U/ml, MBI Fermentas).

O protocolo de amplificação incluiu um passo inicial de desnaturação a 94°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos com três passos cada um: desnaturação a 94°C durante 30 segundos; *annealing* a 58°C durante 30 segundos; extensão a 72°C durante 45 segundos. Foi feita uma extensão final a 72°C durante 7 min.

Quadro 2. Oligonucleótidos específicos usados para amplificação do *TLR7* e tamanho (pb) dos fragmentos amplificados.

Primer 5'→3'	Forward	Reverse	Fragmento (pb)	Temp annealing (°C)
1	CTT TGT GAC TAC ACT TCC TG	CAG CAC ATA CAT CTA CCT AC	137	58
2	GCA ATG ATC CTA GCA TGT CT	GCT GGT TTC AGT TGT TTC CA	249	58
3	CAA AAG AGA GGC AGC AAA TG	GTG TTC GTG GGA ATA CCT C	282	58
4	CTG CAC AGA CAA GCA TTT GA	GGT TTC CAT CCA GGT AAA GG	263	58
5	GCA TCA AGA GGC TGC AGA T	CTT TGT CAA GTT TAG GAA GGC	281	58
6	GGG CCA AAA CTG TTA TTA TCG	GCA TTT ACA GGG ATC TGT AG	318	58
7	CCT AAG TGG AAA TTG CCC TCG	CTG GGG AGA AAA TGC AGA AAT	258	58
8	CTG GAT CTG TCC CAA AAC TT	GCC AAG ATC AAG AAC TTC AAG	261	58
9	CTG AAA ATT CTG CGG ATC AG	GTA ATT GTT CCA GGA CCT GG	277	58
10	CAC CTT CAG GAG ATT CAA GT	GAT GCT GAA AAT CAG AGG AC	246	58
11	GAA AGC TGC TAC AAG TAT GG	AAT GGA GTA AAT CAA GCC GG	211	58
12	CAA CCT TTA GCA GAG CTG AG	CCA GAG TTC TAA GAG ACT CAC	259	58
13	GGT TCT GCA GAA ACT GAT GAT	CCA TCA AAA ACT CCA GAA GGC	228	58
14	GGA GAG AAG GTG ATA ACA GA	GAG GCT TCT GGA ACA GTT G	272	58
15	CCA CAA CCA ACT GAC CAC T	GCA TCA CAG GTG CAC AGA A	252	58
16	CAG CTT CCC AGA AAA TGT C	TTG CTG TCA TCA TCA CCA T	284	58
17	CAA GGG CCA AAG TGT GAT CT	CTG GTA ACC AGT CCC TTT C	347	58
18	CAA ACT GGA AGA CCC AAG AG	GTT TGT TGG CCA CTC AAG G	313	58
19	CCT TTC AGA AGT CCA AGT TC	CCT GAA ATA TGG GCA ATC TC	299	58
20	CTA GTT TAC CAA GGA GAG GC	CCA CTC TTT TAC AGG AGC TG	233	58

A amplificação e a ausência de produtos inespecíficos foram confirmadas por electroforese horizontal em gel de agarose a 2% (Bioline), em tampão TAE 1x, corado com *GelStar* (Cambrex) a 0,002%. Foram aplicados 5µl de produto de PCR juntamente com 3µl de tampão de amostra (50% de glicerol, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno de cianol) e deixou-se correr durante 20 minutos a 90 V. O tamanho dos fragmentos

de PCR foi posteriormente confirmado por comparação com o padrão de pesos moleculares de DNA pUC19 (Fermentas). A visualização foi efectuada num transiluminador de luz ultravioleta.

3.4.2 Pesquisa de alterações genéticas por SSCP

Os produtos de PCR foram diluídos na proporção de 1:1 em tampão desnaturante contendo formamida 95%, 50 mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol. Foram, depois, desnaturados a 94°C durante 10 minutos, e colocados imediatamente em gelo durante 5 min. As amostras foram aplicadas num gel não-desnaturante de MDE (*mutation detection enhancement*) (Cambrex), a uma concentração de 1x, diluído em TBE 0,5x. Como agentes polimerizantes foram usados o persulfato de amónio (APS), a 0,1%, e o Temed, a 0,1%.

A corrida foi realizada num sistema de electroforese vertical (DCode Universal Mutation Detection System, BioRad) a uma temperatura constante de 8°C, durante 12-16h, a 300-350V. Os geles foram depois corados com nitrato de prata, de acordo com o seguinte protocolo. Numa primeira etapa, os geles foram fixados numa solução de etanol a 10% durante 10 minutos, com agitação. Em seguida, foi realizada uma oxidação com ácido nítrico a 1%, durante 3 minutos, para conferir carga negativa a todo o DNA. O gel foi lavado durante alguns segundos com água destilada para retirar o excesso de ácido nítrico. Depois, procedeu-se à coloração do gel com a solução de nitrato de prata (AgNO_3) a 0,012M (que se liga ao DNA, que tem carga negativa), durante 20 min, também com agitação constante. Para retirar o excesso de AgNO_3 do gel, foram realizadas duas lavagens sucessivas com água destilada. Por fim, foi adicionada uma solução de carbonato de sódio a 0,28M até visualização das bandas. A seguir, a revelação foi bloqueada com uma solução de ácido acético a 10%. Os geles foram lavados com água destilada e colocados em glicerol a 10%, O/N, tendo sido depois analisados.

3.4.3 Sequenciação automática de DNA

As amostras que apresentavam diferentes padrões de mobilidade no SSCP foram enviadas para sequenciação (Eurofins MWG Operon, Alemanha). Os produtos de PCR foram purificados a partir de um gel de agarose a 2% (Bioline), usando o kit de purificação NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel, Alemanha), segundo as instruções do fabricante. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências disponíveis nas bases de dados Gen-Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) e Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).

3.5 Análise Estatística

As variáveis foram analisadas utilizando o programa estatístico Graphpad Prism 5. A frequência de cada genótipo foi comparada com o esperado para uma população de Hardy-Weinberg através do teste do χ^2 (Qui-quadrado) ou do teste de Fisher, dependendo do número de amostras em estudo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Capítulo 4

Resultados

4. Resultados

Neste trabalho foram pesquisadas alterações na região codificante, zonas de *splicing* e UTRs do *TLR7*. Para tal foram utilizadas amostras citológicas em que foram identificadas diferentes lesões do colo do útero: ASCUS, LBG, LAG e carcinomas, bem como amostras de controlo correspondentes a citologias normais de mulheres sem qualquer história de lesão do colo do útero (Quadro 3).

Quadro 3. Distribuição dos indivíduos por grau de lesão de colo do útero e frequência da infecção por HPV.

	n	%	% HPV+	% HPV-
ASCUS	8	7,6	12,5	87,5
LBG	23	21,7	60,9	39,1
LAG	11	10,4	72,7	27,3
Carcinoma	24	22,6	100,0	0,0
Controlo	40	37,7	5,0	95,0
Total	106	100,0	--	--

A pesquisa e análise de alterações foram feitas por SSCP e sequenciação automática de DNA. Todas as amostras com um padrão de mobilidade diferente foram sequenciadas, tendo sido depois calculadas as frequências alélicas e genotípicas.

Foram identificadas treze alterações na região codificante e uma alteração na 3'UTR (Quadro 4.) Não foram encontradas quaisquer alterações nos seguintes fragmentos: 1, que inclui os nucleótidos 1 a 97; 2 (nt 317 a 566); 4 (nt 18576 a 18839); 5 (nt 18761 a 19042); 6 (nt 18963 a 19281); 7 (nt 19191 a 19449); 11 (nt 19891 a 20102); 13 (nt 20214 a 20442); 14 (nt 20330 a 20602); 17 (nt 20886 a 21233); e 19 (nt 21407 a 21706).

Quadro 4. Alterações encontradas no *TLR7*.

Fragmento	Nucleótido	Alteração	Polimorfismo
3	18451	G>A	Leu8Leu
3	18459	A>T	Gln11Leu
8	19481	G>A	Glu352Lys
8	19507	G>A	Met360Ile
8	19534	G>A	Leu369Leu
9	19618_19619	Ins G	c.1191_1192InsG
10	19792_19793	Ins A	c.1365_1366InsA
12	20113_20114	Ins A	c.1686_1687InsA
15	20644	G>A	Thr739Thr
15	20653	T>A	Phe742Leu
16	20830	G>A	Thr801Thr
16	20899	T>G	Ser824Arg
18	21409	C>A	Pro994Pro
20	21738	A>G	3'UTR+161

4.1 Fragmento 3 (nt 18 345 a 18 627)

Foram identificadas duas alterações neste fragmento: Leu8Leu e Gln11Leu. As amostras estudadas para este fragmento estão referenciadas na Quadro 5.

Quadro 5. Amostras estudadas para o fragmento 3.

	n	% HPV+	% HPV-
ASCUS	6	33,3	66,7
LBG	7	42,9	57,1
LAG	8	75,0	25,0
Carcinoma	18	100,0	0,0
Controlo	31	0,0	100,0
TOTAL	70		

4.1.1 Leu8Leu

Esta alteração não se encontra descrita e corresponde a uma troca de uma guanina por uma adenina (CTG>CTA), no codão 8, não provocando alteração do aminoácido codificado, a leucina. Esta troca sinónima, Leu8Leu, foi detectada em todas as amostras estudadas para o fragmento 3, independentemente do grau de lesão e da presença de HPV (Fig. 8). Ainda não se encontra confirmada.

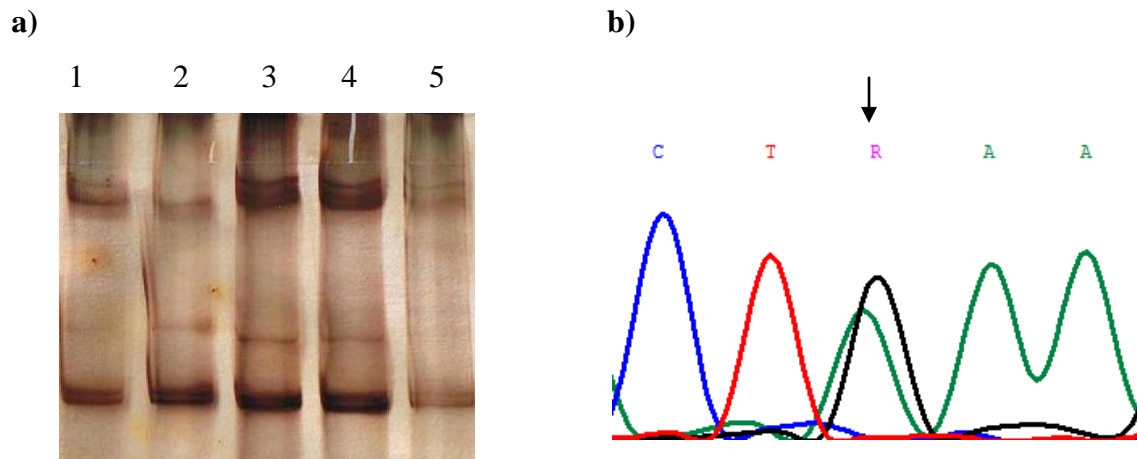


Figura 8. Alteração Leu8Leu. a) Visualização dos padrões de bandas obtidos no SSCP: 1,2,3,4 e 5 – padrão correspondente ao genótipo AG; b) sequenciação de DNA: heterozigótico AG.

4.1.2 Gln11Leu

Outra das alterações encontradas localiza-se na segunda base do codão 11 e corresponde a uma transição CAA>CTA (Fig. 9), que leva a uma alteração *missense* (Gln>Leu). Esta alteração já se encontra descrita na literatura, estando classificada como polimorfismo. O alelo mais prevalente é o A, sendo o genótipo AA o de maior frequência (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

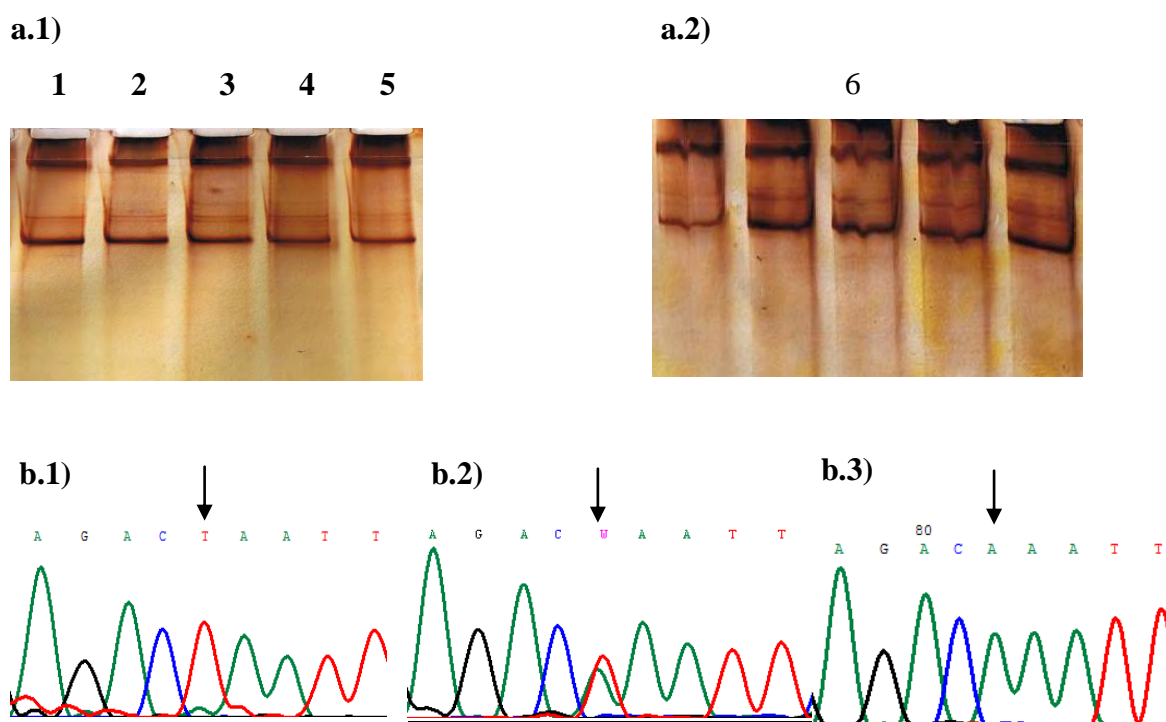


Figura 9. Alteração Gln11Leu. a) Visualização dos padrões de bandas obtidos no SSCP: 1) 1 e 2 – padrão correspondente ao genótipo AT; 3, 4, 5 – padrão correspondente ao genótipo AA. 2) 6 – padrão correspondente ao genótipo TT. b) sequenciação de DNA: 1) homozigótico TT; 2) heterozigótico AT; 3) homozigótico AA.

Os padrões de SSCP obtidos não permitiram distinguir os diferentes genótipos (Fig. 9a). Como tal, foi necessário proceder à sequenciação de todas as amostras estudadas para este fragmento, para obter os respectivos genótipos.

Determinaram-se as frequências alélicas deste polimorfismo e verificou-se, como seria esperado de acordo com a literatura, uma maior prevalência do alelo A (85,71%) em relação ao alelo T (14,29%). Relativamente às frequências alélicas, também não foram observadas quaisquer diferenças significativas (Quadro 6).

Quadro 6. Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo Gln11Leu.

<i>Genótipos</i>	<i>Frequências (%)</i>
AA	74,29
AT	22,86
TT	2,86
Alelos	
A	85,71
T	14,29

Não foram observadas diferenças significativas entre os indivíduos com infecção e os indivíduos sem infecção no que diz respeito às frequências dos genótipos AA, AT e TT (Quadro 7). É de notar que no grupo correspondente aos indivíduos sem infecção o genótipo TT não se encontra representado (Quadro 7).

Quadro 7. Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo Gln11Leu em indivíduos com e sem infecção por HPV (%).

<i>Genótipos</i>	<i>HPV+</i>	<i>HPV-</i>
AA	69,0	78,0
AT	24,1	22,0
TT	6,9	0,0
Alelos		
A	81,0	89,0
T	19,0	11,0

Fomos depois comparar as frequências genóticas e alélicas em mulheres com lesões de diferentes graus (Quadro 8), mas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. O genótipo TT, o mais raro, foi encontrado em amostras com lesões de baixo e alto grau.

Quadro 8. Frequências genóticas e alélicas por grau de lesão do polimorfismo Gln11Leu (%).

Genótipos	Controlo	ASCUS	LBG	LAG	Carcinoma
AA	74,2	83,3	71,4	75,0	72,2
AT	25,8	16,7	14,3	12,5	27,8
TT	0,0	0,0	14,3	12,5	0,0
Alelos					
A	87,1	91,7	78,6	81,3	86,1
T	12,9	8,3	21,4	18,8	13,9

4.2 Fragmento 8 (nt 19 381 a 19 642)

Foram identificadas três alterações nesta região do *TLR7* nas amostras estudadas (Quadro 9): Glu352Lys, Met360Ile e Leu369Leu.

Quadro 9. Amostras estudadas para o fragmento 8.

	n	% HPV+	% HPV-
ASCUS	6	33,3	66,7
LBG	14	42,9	57,1
LAG	6	66,7	33,3
Carcinoma	5	100,0	0
Controlo	40	5,0	95,0
TOTAL	71		

4.2.1 Glu352Lys

Esta alteração não se encontra descrita na literatura e corresponde a uma troca de uma guanina por uma adenina (GAA>AAA), no codão 352, o que resulta numa troca do aminoácido codificado (ácido glutâmico > lisina) (Fig. 10). Esta alteração estava presente em todas as amostras sequenciadas, que incluíram amostras de todos os grupos estudados. No entanto, dado que padrões de SSCP diferentes correspondiam a sequências iguais, não foi possível obter o genótipo de todas as amostras em estudo. Esta alteração ainda não foi confirmada.

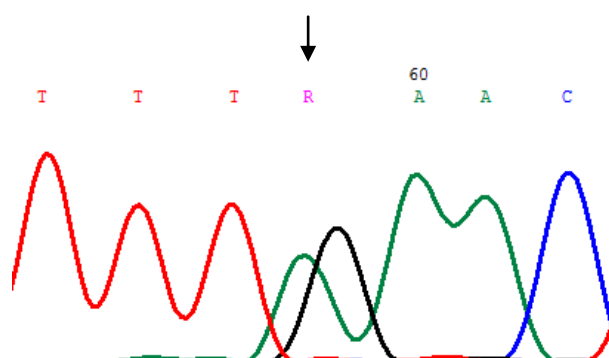


Figura 10. Sequenciação de DNA: genótipo AG.

4.2.2 Met360Ile

Esta alteração não se encontra descrita na literatura e corresponde a uma troca de uma guanina por uma adenina (ATG>ATA), no codão 360, o que resulta numa troca do aminoácido codificado (Metionina > Isoleucina) (Fig. 11). Esta alteração estava presente em todas as amostras sequenciadas, que incluíram amostras de todos os grupos estudados. No entanto, dado que padrões de SSCP diferentes correspondiam a sequências iguais, não foi possível obter o genótipo de todas as amostras em estudo. Esta alteração ainda não foi confirmada.

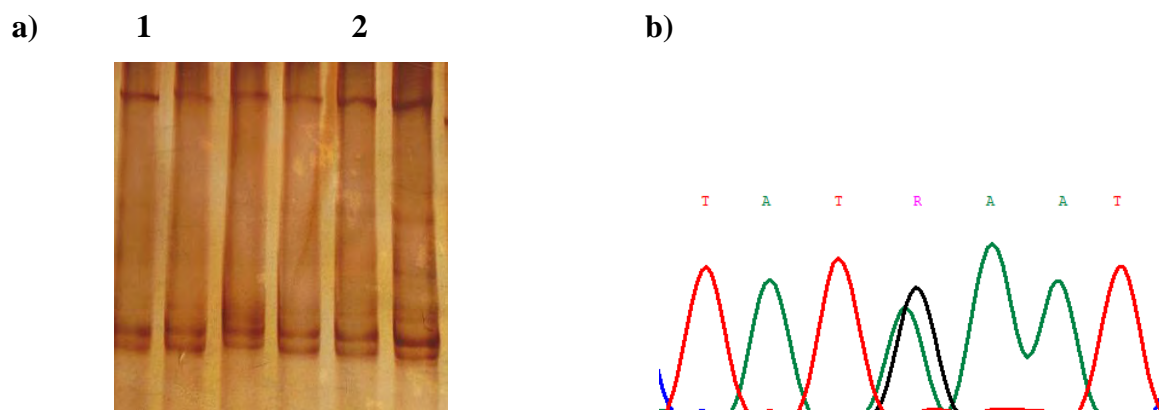


Figura 11. Alteração Met360Ile. a) Visualização dos padrões de bandas obtidos no SSCP: 1 e 2 – padrão correspondente ao genótipo AG; b) sequenciação de DNA: genótipo AG.

4.2.3 Leu369Leu

Esta alteração não se encontra descrita na literatura e corresponde a uma troca de uma guanina por uma adenina (CTG>CTA), no codão 369, o que resulta na transcrição do mesmo aminoácido, uma Leucina (troca sinónima) (Fig. 12). Esta alteração estava presente em todas as amostras sequenciadas, que incluíram amostras de todos os grupos estudados. No entanto, ainda não foi confirmada.

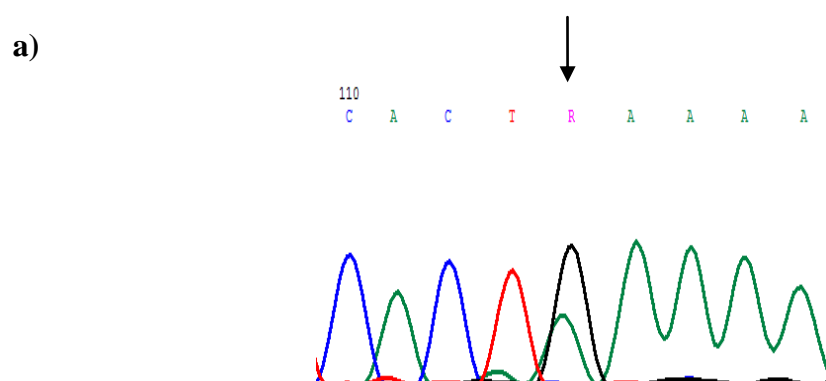


Figura 12. Alteração Leu369Leu. a) Sequenciação de DNA: genótipo AG.

4.3 Fragmento 9 (nt 19 540 a 19 817)

Foi identificada a alteração c.1191_1192InsG, nesta região do *TLR7*, nas amostras estudadas (Quadro 10).

Quadro 10. Amostras estudadas para o fragmento 9.

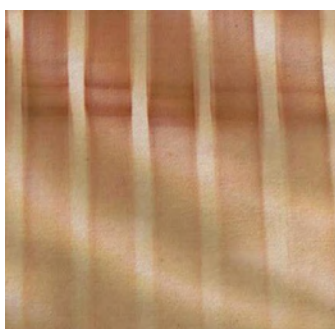
	n	% HPV+	% HPV-
ASCUS	7	28,6	71,4
LBG	9	66,7	33,3
LAG	5	40,0	60,0
Carcinoma	7	100,0	0
Controlo	15	6,7	93,3
TOTAL	43		

4.3.1 c.1191_1192InsG

Esta alteração corresponde à inserção de uma guanina entre os nucleótidos 1191 e 1192 da região codificante e não se encontra descrita na literatura (Fig. 13). Dado que esta alteração apenas foi identificada em 6 das 14 amostras sequenciadas (Quadro 11), não foi possível estabelecer qualquer relação entre esta alteração e o grau de lesão, ou a presença/ausência de HPV. Esta alteração ainda não se encontra confirmada.

a)

1 2 3



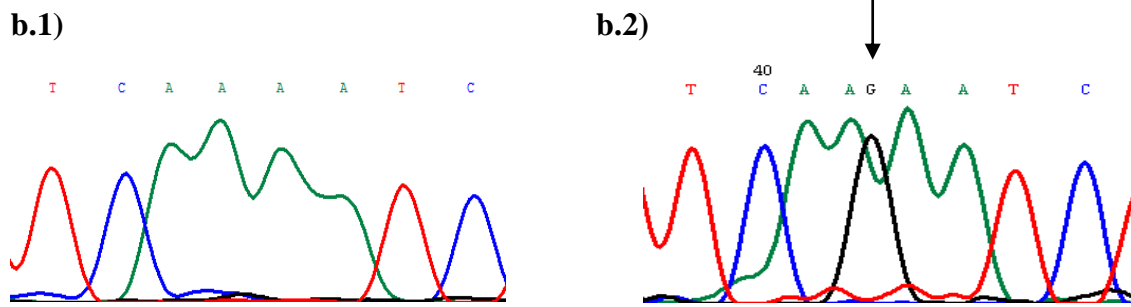


Figura 13. c.1191_1192InsG. a) Visualização dos padrões de bandas obtidos no SSCP: 1 – sem inserção; 2 e 3 – padrão correspondente à inserção c.1191_1192InsG; b) sequenciação de DNA: 1) normal; 2) c.1191_1192InsG.

Quadro 11. Amostras sequenciadas para o fragmento 9.

Lesão	n	Genótipo			
		AA		GG	
		HPV+	HPV-	HPV+	HPV-
Controlo	4	1	3	0	0
ASCUS	5	0	1	2	2
LBG	3	2	0	0	1
LAG	1	0	0	0	1
Carcinoma	1	1	0	0	0
Total	14	4	4	2	4

4.4 Fragmento 10 (nt 19 727 a 19 973)

Foi identificada a alteração c.1365_1366InsA nesta região do *TLR7* nas amostras estudadas (Quadro 12).

Quadro 12. Amostras estudadas para o fragmento 10.

	n	% HPV+	% HPV-
ASCUS	6	50,0	50,0
LBG	7	71,4	28,6
LAG	4	50,0	50,0
Carcinoma	11	100,0	0
Controlo	13	7,7	92,3
TOTAL	41		

4.4.1 c.1365_1366InsA

Esta alteração não se encontra descrita na literatura e corresponde a uma inserção de uma adenina entre os nucleótidos 1365 e 1366 da região codificante (Fig. 14). A alteração c.1365_1366InsA foi detectada em todas as amostras sequenciadas, que incluíam amostras representativas de todos os grupos estudados. Não foi possível estabelecer qualquer relação entre esta alteração e o grau de lesão ou a presença/ausência de HPV. Esta alteração ainda não se encontra confirmada.

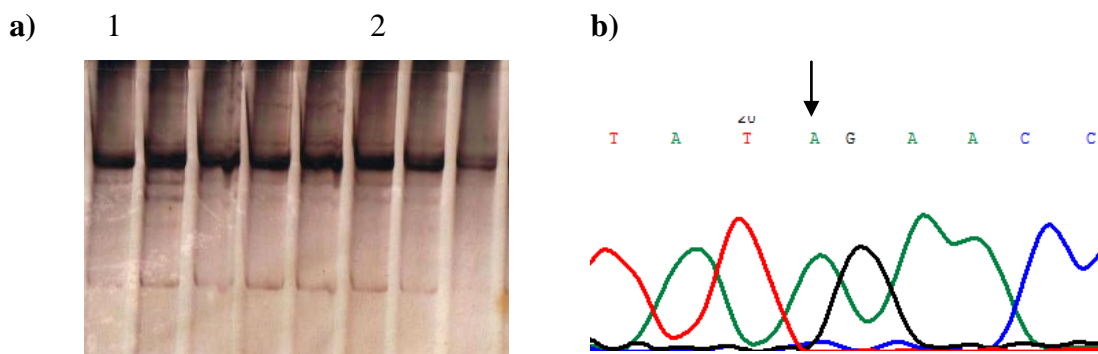


Figura 14. c.1365_1366InsA. a) Visualização dos padrões de bandas obtidos no SSCP: 1 e 2 – padrão correspondente à inserção de uma adenina. b) Sequenciação de DNA: c.1365_1366InsA.

4.5 Fragmento 12 (nt 20 041 a 20 300)

Foi identificada a alteração c.1686_1687InsA nesta região do *TLR7* nas amostras estudadas (Quadro 13).

Quadro 13. Amostras estudadas para o fragmento 12.

	n	% HPV+	% HPV-
ASCUS	5	40,0	60,0
LBG	10	40,0	60,0
LAG	7	71,4	28,6
Carcinoma	6	100,0	0,0
Controlo	16	0,0	100,0
TOTAL	44		

4.5.1 c.1686_1687InsA

Esta alteração corresponde à inserção de uma adenina entre os nucleótidos 1686 e 1687 da região codificante (Fig. 15) e não se encontra descrita na literatura. Esta alteração foi identificada em todas as amostras sequenciadas e que incluíam amostras de todos os grupos estudados. Não foi possível estabelecer qualquer relação com o grau de lesão ou a presença/ausência de HPV. Esta alteração ainda não se encontra confirmada.

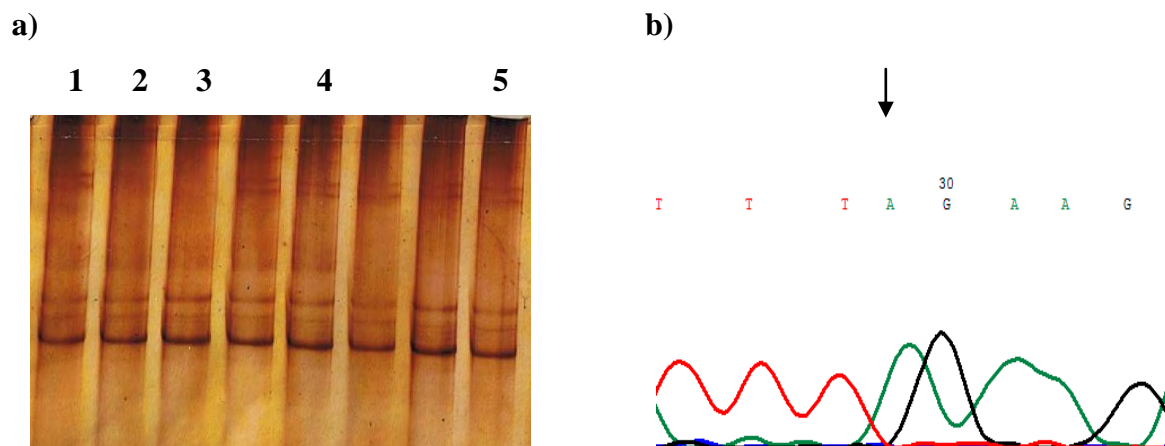


Figura 15. c.1686_1687InsA. a) Visualização dos padrões de bandas obtidos no SSCP: 1, 2, 3, 4 e 5 – padrão correspondente c.1686_1687InsA . b) sequenciação de DNA: c.1686_1687InsA.

4.6 Fragmento 15 (nt 20 547 a 20 799)

Foram identificadas duas alterações nesta região do *TLR7* nas amostras estudadas (Quadro 14): Thr739Thr e Phe742Leu.

Quadro 14. Amostras estudadas para o fragmento 15.

	n	% HPV+	% HPV-
ASCUS	4	50,0	50,0
LBG	10	30,0	70,0
LAG	5	80,0	20,0
Carcinoma	6	100,0	0,0
Controlo	18	0,0	100,0
TOTAL	43		

4.6.1 Thr739Thr

Esta alteração não se encontra descrita na literatura e corresponde a uma troca de uma guanina por uma adenina (ACG>ACA), no codão 739, o que resulta na transcrição do mesmo aminoácido, uma treonina (Fig. 16).

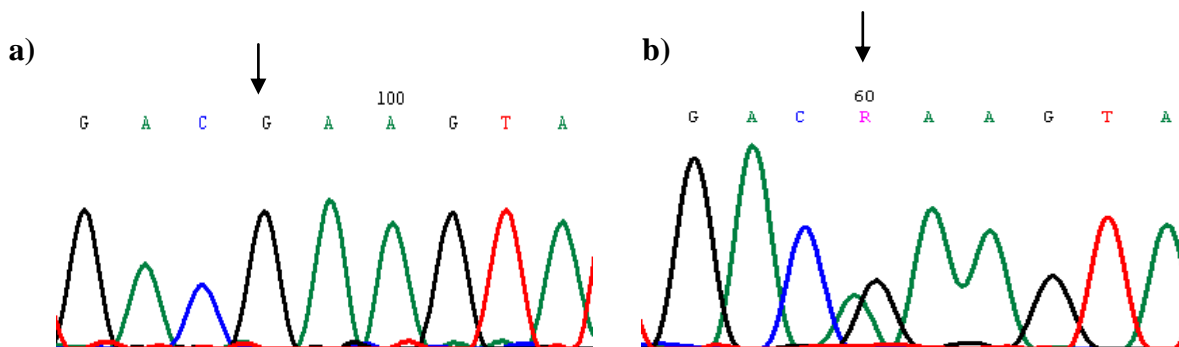


Figura 16. Thr739Thr. Sequenciação de DNA: a) genótipo GG; b) genótipo AG.

Esta alteração foi identificada em 5 das 13 amostras sequenciadas (Quadro 15). Os padrões de SSCP não permitiram determinar o genótipo das restantes amostras. Como tal, não foi possível estabelecer qualquer relação entre esta alteração e o grau de lesão, ou a presença/ausência de HPV. Esta alteração ainda não se encontra confirmada.

Quadro 15. Amostras sequenciadas para o fragmento 15.

Lesão	n	Genótipo			
		GG		AG	
		HPV+	HPV-	HPV+	HPV-
Controlo	5	0	2	0	3
ASCUS	2	1	1	0	0
LBG	3	0	2	1	0
LAG	1	1	0	0	0
Carcinoma	2	1	0	1	0
Total	13	3	5	2	3

4.6.2 Phe742Leu

Esta alteração não se encontra descrita na literatura e corresponde a uma troca de uma timina por uma adenina (TTT>TTA), no codão 742, o que resulta numa troca do aminoácido codificado (Fenilalanina > Leucina) (Fig. 17).

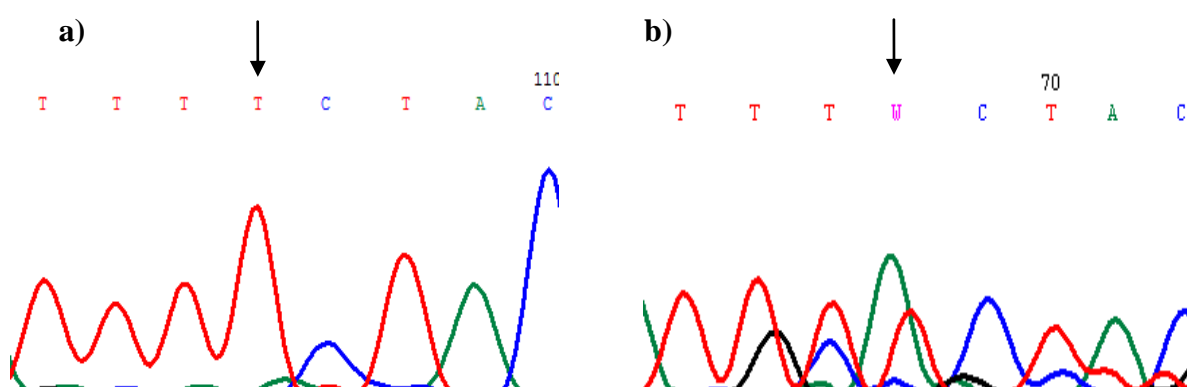


Figura 17. c.2225_2226InsA. Sequenciação de DNA. a) genótipo TT; b) genótipo AT.

Esta alteração foi identificada em apenas duas amostras de carcinoma (Quadro 16). Os padrões de SSCP não permitiram determinar o genótipo das restantes amostras. Como

tal, não foi possível estabelecer qualquer relação entre esta alteração e o grau de lesão ou a presença/ausência de HPV. Esta alteração ainda não foi confirmada.

Quadro 16. Amostras sequenciadas para o fragmento 15.

Lesão	n	<i>Genótipo</i>			
		<i>TT</i>		<i>TT</i>	
		<i>HPV+</i>	<i>HPV+</i>	<i>HPV+</i>	<i>HPV-</i>
Controlo	5	0	5	0	0
ASCUS	2	1	1	0	0
LBG	3	1	2	0	0
LAG	1	1	0	0	0
Carcinoma	2	0	0	2	0
Total	13	3	8	2	0

4.7 Fragmento 16 (nt 20 721 a 21 005)

Foram identificadas duas alterações nesta região do *TLR7* nas amostras estudadas (Quadro 17): Tre801Tre e Ser824Arg.

Quadro 17. Amostras estudadas para o fragmento 16.

	n	% HPV+	% HPV-
ASCUS	4	50,0	50,0
LBG	11	54,5	45,5
LAG	6	83,3	16,7
Carcinoma	4	100,0	0,0
Controlo	12	0,0	100,0
TOTAL	37		

4.7.1 Thr801Thr

Esta alteração encontra-se descrita na literatura e corresponde a uma troca de uma guanina por uma adenina (ACG>ACA), no codão 801, o que resulta na transcrição do mesmo aminoácido, uma treonina (Fig. 18). Dado que esta alteração apenas foi detectada em 5 das 17 amostras que foram sequenciadas (Quadro 18), não foi possível estabelecer qualquer relação entre esta alteração e o grau de lesão, ou a presença/ausência de HPV. Os padrões de SSCP não permitiram identificar a alteração nem determinar o genótipo das amostras. Daí não ter sido possível determinar o genótipo de todas as amostras estudadas.

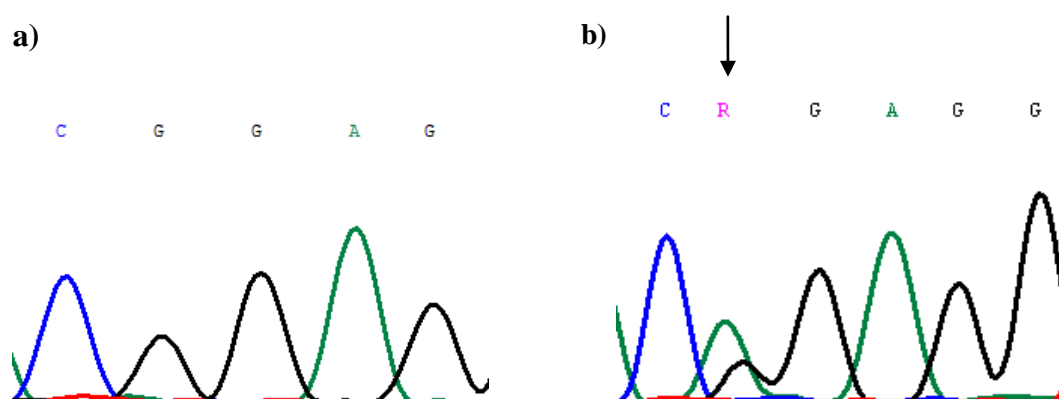


Figura 18. Tre801Tre. a) Sequenciação de DNA: genótipo GG; b) genótipo AG.

Quadro 18. Amostras sequenciadas para o fragmento 16.

Lesão	n	Genótipo			
		GG		GG	
		HPV+	HPV+	HPV+	HPV+
Controlo	2	0	1	0	1
ASCUS	3	2	1	0	0
LBG	5	1	3	1	0
LAG	5	2	1	2	0
Carcinoma	2	1	0	1	0
Total	17	6	6	4	1

4.7.2 Ser824Arg

Esta alteração não se encontra descrita na literatura e corresponde a uma troca de uma timina por uma guanina (AGT>AGG), no codão 824, o que resulta na troca do aminoácido codificado (Serina > Arginina) (Fig. 19). Dado que esta alteração apenas foi detectada em 5 das 17 amostras que foram sequenciadas (Quadro 19), não foi possível estabelecer qualquer relação entre esta alteração e o grau de lesão, ou a presença/ausência de HPV. Os padrões de SSCP não permitiram identificar a alteração nem determinar o genótipo das restantes amostras. Esta alteração ainda não se encontra confirmada.

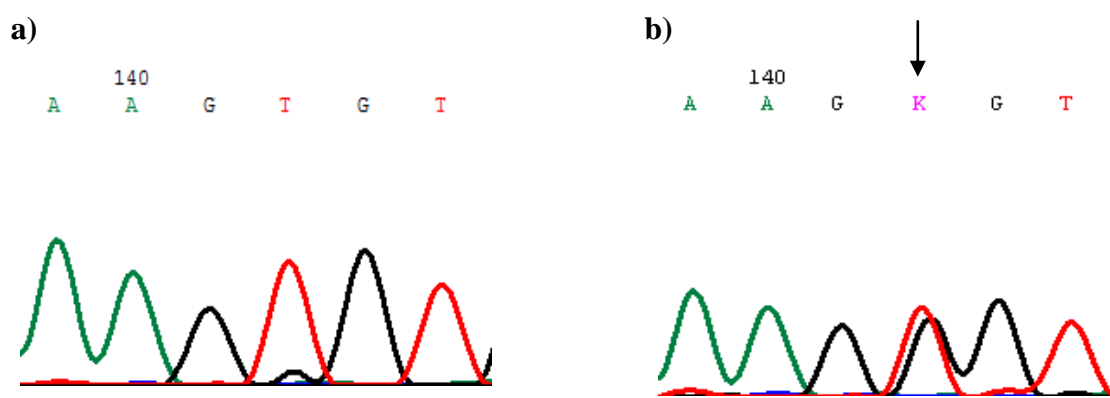


Figura 19. Ser824Arg. a) Sequenciação de DNA: genótipo TT; b) genótipo GT.

Quadro 19. Amostras sequenciadas para o fragmento 16.

Lesão	n	Genótipo			
		TT		TT	
		HPV+	HPV+	HPV+	HPV+
Controlo	2	0	2	0	0
ASCUS	3	1	1	1	0
LBG	5	2	1	0	2
LAG	5	3	0	1	1
Carcinoma	2	2	0	0	0
Total	17	8	4	2	3

4.8 Fragmento 18 (nucleótido 21 168 a 21 481)

Foi identificada a alteração Pro994Pro nesta região do *TLR7* nas amostras estudadas (Quadro 20).

Quadro 20. Amostras estudadas para o fragmento 18.

	n	% HPV+	% HPV-
ASCUS	6	16,7	83,3
LBG	10	60,0	40,0
LAG	9	66,7	33,3
Carcinoma	7	100,0	0,0
Controlo	14	7,1	92,9
TOTAL	46		

4.8.1 Pro994Pro

Esta alteração não se encontra descrita na literatura e corresponde a uma troca de uma citosina por uma adenina (CCC>CCA), no codão 994, o que resulta na transcrição do mesmo aminoácido, uma prolina (Fig. 20). Dado que esta alteração apenas foi detectada em 9 das 13 amostras que foram sequenciadas (Quadro 21), não foi possível estabelecer qualquer relação entre esta alteração e o grau de lesão, ou a presença/ ausência de HPV. Os padrões de SSCP não permitiram determinar o genótipo das restantes amostras. Esta alteração ainda não se encontra confirmada.

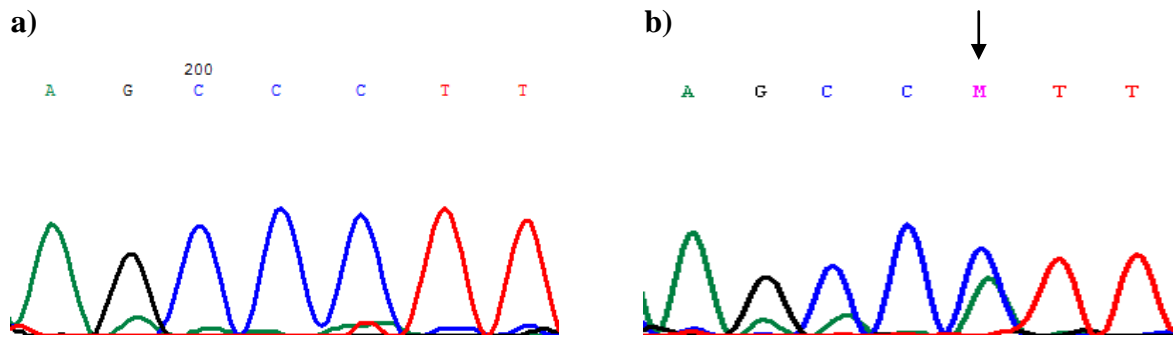


Figura 20. Pro994Pro. a) Sequenciação de DNA: genótipo CC; b) genótipo AC.

Quadro 21. Amostras sequenciadas para o fragmento 18.

Lesão	n	Genótipo			
		CC		CC	
		HPV+	HPV+	HPV+	HPV+
Controlo	1	0	1	0	0
ASCUS	1	0	0	0	1
LBG	1	1	0	0	0
LAG	5	0	0	3	2
Carcinoma	5	2	0	3	0
Total	13	3	1	6	3

4.9 Fragmento 20 (nt 21 601 a 21 834)

Foi identificada a alteração 3'UTR+161 nesta região do *TLR7* nas amostras estudadas (Quadro 22).

Quadro 22. Amostras estudadas para o fragmento 20.

	n	% HPV+	% HPV-
ASCUS	6	33,3	66,7
LBG	15	60,0	40,0
LAG	11	72,7	27,3
Carcinoma	8	100,0	0,0
Controlo	16	6,3	93,8
TOTAL	56		

4.9.1 3'UTR+161

Esta alteração localiza-se no nucleótido 161 da 3'UTR e corresponde à troca de uma adenina por uma guanina (Fig. 21). Esta alteração não se encontra descrita na literatura e foi identificada em apenas 3 amostras que foram sequenciadas (1 controlo, 1 ASCUS e 1 carcinoma). A análise dos padrões de SSCP não possibilitou a sua detecção. Como tal, não foi possível determinar o genótipo das restantes amostras. Assim, não foi possível estabelecer qualquer relação entre esta alteração e o grau de lesão, ou a presença/ausência de HPV. Esta alteração ainda não se encontra confirmada.

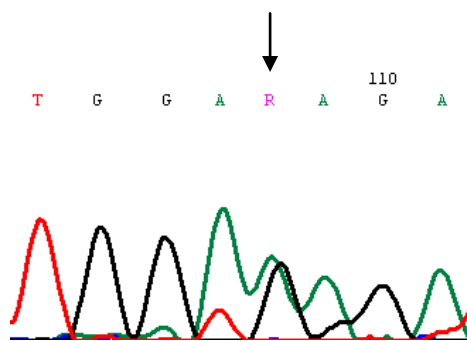


Figura 21. 3'UTR+161. Sequenciação de DNA: genótipo AG.

Capítulo 5

Discussão

5. Discussão

O desenvolvimento de cancro do colo do útero está associado a infecções persistentes por HPV de alto risco (Bosch *et al.*, 2002; Buitrago-Pérez *et al.*, 2009; Schlecht *et al.*, 2001; Stanley *et al.*, 2007). As lesões CIN são as precursoras de carcinoma do colo do útero. Estas podem regredir, persistir ou progredir naturalmente (Nicol *et al.*, 2005). As mulheres com CIN de alto grau, não tratadas, apresentam um risco elevado para desenvolver cancro do colo do útero, enquanto que, em mulheres que realizem tratamento, o risco é muito baixo (Nam *et al.*, 2009).

Normalmente, aproximadamente 90% das lesões associadas ao HPV regredem espontaneamente, no prazo de dois anos, como resultado de uma resposta imunológica eficaz. No entanto, cerca de 10% destas infecções não são resolvidas pelo sistema imunológico do hospedeiro e persistem (Herbert & Coffin, 2008; Stanley *et al.*, 2007). Alterações em factores imunológicos do hospedeiro e os mecanismos de evasão imunitária do HPV podem ser os responsáveis por estas infecções persistentes, relevantes na patogénese do cancro do colo do útero, na medida em que podem provocar mudanças na produção de citocinas, bem como levar a uma ausência de responsividade às mesmas (Nicol *et al.*, 2005).

Os PRRs, como é o caso dos TLRs, são factores do sistema imunológico que têm um papel importante na defesa do hospedeiro contra microorganismos (Albiger *et al.*, 2007). Os TLRs, ao reconhecerem ligandos específicos dos microorganismos e através do uso de moléculas adaptadoras distintas, levam à activação de diferentes vias de sinalização. Estas resultam na activação da resposta imunológica inata e na iniciação da resposta adquirida (Albiger *et al.*, 2007).

O TLR7, que reconhece RNA viral de cadeia simples, é uma proteína muito importante no desencadear de uma resposta imunológica contra o HPV, na medida em que activa uma cascata de sinalização responsável pela libertação de IFNs do tipo I e outras citocinas pró-inflamatórias, no local de infecção (Akira *et al.*, 2006). O imiquimod, um agonista do TLR7, tem sido utilizado com sucesso no tratamento de lesões induzidas por HPV. Outros agonistas usados no tratamento de infecções por HPV incluem o 3M-002 (agonista do TLR8) e o resiquimod (agonista do TLR8/7) (Fahey *et al.*, 2009).

Determinados polimorfismos encontrados nos genes que codificam os TLRs são responsáveis pela inativação ou alteração das funções destas proteínas, comprometendo a resposta imunológica. Na presença destas alterações, processos como a activação de cascatas sinalizadoras, a produção de moléculas efectoras, a secreção de citocinas e quimioquinas, a eliminação de microorganismos e o desencadear de respostas imunológicas adquiridas, podem estar comprometidos (Córdova *et al.*, 2009). Polimorfismos nestes genes têm sido associados à patogénese de doenças muito complexas como o cancro (Staros, 2005).

A investigação de factores genéticos ligados à resposta imunológica poderá ser importante para a compreensão da capacidade distinta de diferentes mulheres para controlar e eliminar a infecção por HPV. Na medida em que o TLR7 tem uma função importante no reconhecimento de HPV e, consequentemente, no desenvolvimento de uma resposta imunológica eficaz contra este vírus, este trabalho teve como objectivo tentar perceber se alterações genéticas no TLR7 poderiam estar relacionadas com a susceptibilidade à infecção por HPV, bem como condicionar o desenvolvimento de cancro do colo do útero. Para tal, as regiões codificantes, regiões de *splicing* e UTRs do TLR7 foram analisadas para a presença de pequenas alterações genéticas.

Foram identificadas treze alterações na região codificante e uma alteração na 3'UTR. Nenhuma das alterações identificadas estava localizada nas regiões que codificam dois tipos de domínios funcionalmente importantes do TLR7, nomeadamente as regiões ricas em repetições de leucina (nt 158 - 369) e a região que inclui o domínio TIR (nt 893 - 1034) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

O polimorfismo mais extensamente estudado neste trabalho, Gln11Leu, já se encontra descrito na literatura. Foi encontrada uma maior prevalência do alelo A (85,71%) em relação ao alelo T (14,29%), o que está de acordo com o descrito na literatura (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Relativamente a indivíduos com infecção e sem infecção, não foram observadas quaisquer diferenças significativas, quer no que respeita às frequências alélicas, quer às genotípicas. O genótipo TT é o mais raro e apenas se encontra representado em amostras com lesões de baixo e alto grau. A utilização de um maior número de amostras no estudo deste polimorfismo seria útil no esclarecimento de uma possível associação com a infecção e/ou persistência de HPV.

O polimorfismo Gln11Leu encontra-se localizado numa região do gene que inclui o ectodomínio do TLR7. É através deste domínio que, após a ligação de componentes virais, ocorre a dimerização necessária à activação do TLR7 (Edwards *et al.*, 2008). Este polimorfismo pode ser, então, importante para a resposta imunológica contra o HPV, já que pode comprometer a activação das células através do TLR7.

Uma vez identificado este polimorfismo nas amostras estudadas, seria de bastante interesse analisar se o mesmo afecta a dimerização e resposta da célula à activação via TLR7. O uso de métodos de análise funcional iria permitir analisar o efeito deste polimorfismo na actividade da proteína TLR7. O objectivo principal era demonstrar se as células activadas através do TLR7 de indivíduos com os diferentes genótipos relativos a este polimorfismo produzem ou não moléculas importantes na resposta imunológica, nomeadamente através da quantificação de citocinas, como os IFNs do tipo I, a IL-1 e a IL-6. Caso fossem observadas alterações da função, poder-se-ia especular que, dada a localização da alteração, estas se deveriam a problemas na dimerização do TLR7 e ligação de proteínas adaptadoras, como a MyD88, após ligação de componentes microbianos. Tal poderia ser investigado com recurso a técnicas de análise de proteínas, como a imunoprecipitação.

Schott e colaboradores relacionaram o polimorfismo Gln11Leu com a susceptibilidade a infecção crónica por HCV. Como o HCV é um vírus de RNA de cadeia simples, o TLR7 tem um papel importante na resposta imunológica contra este vírus. Estes autores observaram que a troca A>T estava mais representada em indivíduos com infecção crónica por HCV do que em indivíduos portadores de outras doenças hepáticas crónicas e em indivíduos saudáveis (Schott *et al.*, 2008). O polimorfismo Gln11Leu também foi associado à progressão da infecção por HIV-1, na medida em que foi relacionado com elevadas cargas virais, bem como com a aceleração da progressão da imunossupressão nos indivíduos infectados (Oh *et al.*, 2009). Oh e colaboradores também observaram que as células mononucleares do sangue periférico de indivíduos que apresentavam esta substituição nucleotídica secretavam menos IFN- α , após activação através do TLR7, do que células de indivíduos AA.

O polimorfismo Thr801Thr, também detectado por nós, foi estudado por Schott e colaboradores, que observaram uma menor prevalência deste em indivíduos com infecção crónica por HCV comparativamente a indivíduos portadores de outras doenças hepáticas

crónicas e a indivíduos saudáveis. Este facto parece sugerir uma associação deste polimorfismo a uma maior resistência à infecção por HCV (Schott *et al.*, 2008). No entanto, dado o pequeno número de amostras por nós estudado, não podemos relacionar este polimorfismo com a infecção por HPV, nem com o grau de lesão.

As restantes alterações identificadas neste trabalho ainda não foram confirmadas. Todas as alterações estão localizadas na região codificante do gene, excepto uma transição (A>G) localizada na 3'UTR. Das treze alterações identificadas neste estudo, cinco são alterações *missense*, cinco são alterações sinónimas e três são inserções com alteração da pauta de leitura (*frameshift*).

As alterações *missense* Glu352Lys, Met360Ile, Phe742Leu e Ser824Arg dão origem à substituição de um aminoácido na cadeia polipeptídica, o que poderá comprometer a função do TLR7. As consequências deste tipo de mutação pontual podem ser graves ou moderadas, dependendo da intensidade com que estas alterações afectam a actividade funcional da proteína que o gene codifica. Os efeitos fenotípicos são tanto mais drásticos quanto maior for a diferença na natureza química das cadeias laterais dos resíduos dos aminoácidos, e também dependem muito do papel que esse resíduo desempenha na estrutura e função da proteína em causa. No caso da alteração Glu352Lys, ocorre a troca de um aminoácido ácido por um básico; na alteração Ser824Arg ocorre a troca de um aminoácido polar neutro por um aminoácido básico. As alterações Met360Ile e Phe742Leu são trocas conservadoras pois os aminoácidos são todos apolares. Se afectarem uma posição sensível da proteína podem resultar na inactivação da proteína, ou numa actividade anormal da mesma. Ou seja, estas trocas apesar de manterem o carácter químico e eléctrico do resíduo, podem ter efeitos drásticos se ocorrerem em locais funcionalmente importantes da proteína.

Relativamente às cinco alterações sinónimas identificadas (Leu8Leu, Leu369Leu, Thr739Thr, Thr801Thr e Pro994Pro), apesar de estas não alterarem a sequência de aminoácidos na proteína, podem ter consequências funcionais e/ou de expressão proteica. Por exemplo, estas trocas sinónimas podem alterar a estabilidade do mRNA ou comprometer a ligação correcta de anti-codões, que são essenciais para a síntese das proteínas. As alterações sinónimas podem ter consequências importantes ao nível do RNA de transferência (tRNA) uma vez que a diversidade de moléculas de tRNA, na maioria das células, é maior do que o número de aminoácidos usados na síntese proteica. Apesar de

cada aminoácido ter mais do que um tRNA de ligação, há uma utilização preferencial de determinados anti-codões, independentemente do facto de o aminoácido ser o mesmo. Deste modo, quando há uma troca sinónima, a formação da proteína e, consequentemente, a sua função, podem ser afectadas. As trocas sinónimas também podem ter influência a nível da função celular, ao afectarem a produção ou a ligação de microRNAs (miRNA). Os miRNA são pequenas moléculas de RNA não codificantes (cerca de 18-24 nucleótidos) que regulam negativamente a expressão génica. Estas moléculas desempenham um papel importante na regulação da transcrição, nomeadamente através da degradação de mRNA (Nelson & Weiss, 2008; Osada & Takahashi, 2007). Uma vez que os miRNA podem ser codificados em qualquer parte do genoma (regiões codificantes, regiões não codificantes e regiões inter-génicas), as alterações sinónimas anteriormente descritas podem afectar a produção de miRNA ou a sua ligação ao mRNA alvo e, desta forma, comprometer a regulação da expressão génica.

No caso das três inserções encontradas (c.1191_1192InsG, c.1365_1366InsA e c.1686_1687InsA), estas vão alterar a pauta de leitura do TLR7. Esta reorganização da sequência de bases, para além de originar uma nova sequência de codões e, consequentemente, a tradução do TLR7, pode também provocar o aparecimento prematuro de um codão stop, podendo dar origem a uma proteína truncada.

Relativamente à alteração encontrada na 3'UTR (3'UTR+161), esta também pode ser significativa na medida em que poderá afectar a expressão do TLR7. A 3'UTR, embora não seja uma região codificante, inclui sequências importantes para a regulação da expressão génica às quais se podem ligar diferentes proteínas, nomeadamente factores de transcrição, e miRNAs. Para além disso, as regiões 3'UTR possuem sequências de localização do mRNA, que dirigem os mRNA para os locais adequados dentro da célula. Este facto é muito importante, uma vez que a localização do mRNA está geralmente associada com o controlo da transcrição.

Neste trabalho, com excepção do polimorfismo Gln11Leu, não foi possível estabelecer qualquer relação entre a infecção por HPV e o grau de lesão com alterações no TLR7, já que não nos foi possível determinar o genótipo de um número suficiente de amostras devido às limitações encontradas na análise dos resultados.

A técnica de SSCP utilizada neste trabalho apresentou algumas limitações. Esta técnica foi eleita inicialmente para a detecção de pequenas alterações uma vez que seria

uma técnica bastante sensível, bem como permitiria estudar um grande número de amostras e, assim, diminuir o número de amostras sequenciadas. No entanto, em várias ocasiões, embora tenham sido detectados padrões de migração diferentes entre si, a sequenciação revelou que os fragmentos apresentavam a mesma sequência de bases. Por outro lado, algumas alterações identificadas por sequenciação não deram origem a padrões de mobilidade diferentes no SSCP. As limitações observadas poderão estar relacionadas com as condições físicas da electroforese, como o tempo, a temperatura, a voltagem excessiva e o meio iónico do tampão. Estes factores podem alterar a estrutura terciária da molécula de DNA de cadeia simples, afectando assim a sensibilidade do SSCP. Factores técnicos como as quantidades de DNA nos poços do gel, a contaminação dos mesmos com as amostras adjacentes e a presença de produtos inespecíficos no produto de PCR, também podem ter sido factores condicionantes na obtenção de resultados mais fidedignos durante a execução deste trabalho. Para tal, a quantidade de DNA utilizada deveria ter sido rigorosa de modo a garantir que o DNA carregado nos poços era igual em todas as amostras, o que iria permitir uma maior reprodutibilidade desta técnica, bem como uma melhor análise dos resultados obtidos. Dever-se-ia igualmente ter procedido à purificação do fragmento de DNA, antes de efectuar a técnica SSCP, de modo a eliminar produtos inespecíficos que poderão ter contribuído para os padrões de migração observados.

Como já referido, a sensibilidade do SSCP decresce com o aumento do tamanho dos fragmentos. O tamanho dos fragmentos obtidos por amplificação também poderá ter sido uma condicionante na execução desta técnica, uma vez que a média de tamanho dos 20 fragmentos amplificados foi de 264 pares de bases (pb) e a sensibilidade desta técnica encontra-se próxima de 100% em fragmentos com 100-150 pb.

A sequenciação automática de DNA seria o método ideal, em alternativa ao uso da técnica SSCP, pois permite analisar cada uma das bases da sequência em estudo e assim obter resultados mais fidedignos que permitissem esclarecer os resultados duvidosos encontrados. Para tal, deveria ser efectuada a sequenciação de todas as amostras, com *primers forward* e *reverse*, após a amplificação dos fragmentos por PCR. No entanto, apesar de todas as vantagens referidas, esta solução tornar-se-ia muito dispendiosa. Deste modo, na impossibilidade de utilizar a sequenciação em todas as amostras, poder-se-iam ter utilizado outras técnicas de detecção de mutações que apresentassem sensibilidade e especificidade na detecção de alterações de uma única base na sequência de DNA.

Algumas técnicas como a DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), a HA (*Heteroduplex Analysis*) e a CSGE (*Conformation Sensitive Gel Electrophoresis*) baseiam-se em diferenças de mobilidade electroforética que fragmentos com sequências de DNA normais e alteradas apresentam (Molina & Tobo, 2004). Estas técnicas permitem pesquisar alterações pontuais em fragmentos de DNA (Molina & Tobo, 2004).

No caso das alterações c.1053_1054InsA, Met360Ile, Leu369Leu e Thr739Thr para a sua confirmação, foi realizada sequenciação com o *primer reverse* em algumas amostras com suspeita de alteração. No entanto, as alterações não foram confirmadas. Assim, as alterações inicialmente identificadas poder-se-iam dever simplesmente a artefactos decorrentes da técnica de sequenciação ou a possíveis contaminações do DNA durante a sua amplificação e/ou purificação. De facto, outras técnicas seriam úteis no seu esclarecimento.

Existe uma enorme variedade de métodos de análise de DNA complementares às técnicas de detecção de mutações. Uma vez que já conhecemos o local e o tipo de alteração, poderíamos realizar técnicas mais específicas que necessitam de um conhecimento prévio da região/sequência a estudar. Alguns destes métodos baseiam-se nas seguintes características: diferenças de tamanho da sequência amplificada, presença ou ausência de sequências de interesse, detecção de locais de restrição para endonucleases de restrição, e hibridação com sondas específicas ASO (*allele specific oligonucleotides*) (Videira, 2001).

Uma vez que a técnica de sequenciação permitiu identificar as possíveis catorze alterações referidas, a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) seria o melhor método a utilizar para confirmação destas alterações. A técnica de RFLP utiliza endonucleases de restrição que reconhecem sequências específicas (sequências de quatro a seis nucleótidos) nos produtos amplificados. Os diferentes fragmentos resultantes da digestão são separados por electroforese em gel de agarose de acordo com o seu tamanho e o resultado é interpretado de acordo com os padrões de bandas obtidos no gel. Uma vez que esta técnica é efectuada no laboratório, seria a seleccionada para estudar todas as possíveis alterações pontuais detectadas, sendo apenas necessário utilizar enzimas de restrição que reconhecessem as sequências específicas das regiões de interesse.

Capítulo 6

Conclusões e perspectivas futuras

6. Conclusões e Perspectivas Futuras

Neste trabalho fomos pesquisar alterações no *TLR7* usando as técnicas de PCR-SSCP e sequenciação de DNA. Das alterações encontradas, apenas foi possível estudar a associação do polimorfismo Gln11Leu com a infecção por HPV e desenvolvimento de cancro do colo do útero. No entanto, não foram observadas quaisquer diferenças significativas.

No que respeita às restantes alterações, não foi possível tirar qualquer conclusão, uma vez que não houve possibilidade para determinar o genótipo de um número suficiente de amostras. Tal deveu-se a limitações da metodologia usada para o rastreio de alterações genéticas: o PCR-SSCP.

A técnica de pesquisa de alterações genéticas, bem como o reduzido número de amostras estudados foram as grandes condicionantes deste estudo. Para ultrapassar estas limitações, e de modo a dar continuidade a este trabalho, começaríamos por confirmar todas as alterações detectadas neste trabalho, nomeadamente utilizando a técnica de RFLP. De seguida, obter um grupo de amostras com representatividade em número e tipo (amostras de todo o tipo de lesões bem como amostras controlo) e efectuar neste novo grupo uma pesquisa das alterações confirmadas. Para tal, poderia ser utilizada a mesma metodologia utilizada para a confirmação das alterações.

Se estas alterações se confirmassem, teriam de ser estudadas as suas consequências funcionais. As alterações *missense* (Gln11Leu, Glu352Lys, Met360Ile, Phe742Leu e Ser824Arg), bem como as inserções (c.1191_1192InsG, c.1365_1366InsA e c.1686_1687InsA), seriam de particular interesse uma vez que as primeiras alteram a sequência de aminoácidos da proteína e as segundas provocam alteração da pauta de leitura, sendo alterações com grande probabilidade de causarem grandes alterações no TLR7.

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

- Akira, S., Hoshino, K. (2003). Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling. *J Infect Dis* 187:S356-63.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.
- Albiger, B., Dahlberg, S., Henriques-Normark, B., Normark, S. (2007). Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med* 261:511-28.
- Ault, K. A. (2006). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol* 40470.
- Bamforth, J., McLaren, H., Osborn, G. R., Wrigley, A. J. (1956). Discussion on the value of vaginal cytology in the diagnosis of carcinoma. *Proc R Soc Med* 49:245-52.
- Bauer, S., Pigisch, S., Hangel, D., Kaufmann, A., Hamm, S. (2008). Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9. *Immunobiology* 213:315-28.
- Bekkers, R. L., Massuger, L. F., Bulten, J., Melchers, W. J. (2004). Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. *Rev Med Virol* 14:95-105.
- Bosch, F. X., de Sanjose, S. (2007). The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers* 23: 213-27.
- Bosch, F. X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C. J., Shah, K. V. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55:244-65.
- Buitrago-Pérez, A., Garaulet, G., Vázquez-Carballo, A., Paramio, J., García-Escudero, R. G., Guillermo (2009). Molecular Signature of HPV-Induced Carcinogenesis: pRb, p53 and Gene Expression Profiling *Infect Agent Cancer* 10: 26-34.
- Buitrago, J. M. G. d., Jimenez, J. M. M. (2001). "Patologia Molecular," 1ª Ed/Ed. Mcgraw-Hill Interamericana de España, S.A., Aravaca.
- Castle, P. E. (2009). The evolving definition of carcinogenic human papillomavirus. *Infect Agent Cancer* 4:7.
- Castro, M. A. (2003). Condiloma Acuminatum *Rev Port Clin Geral* 19:185-91.

- Cobo, F., Concha, A., Ortiz, M. (2009). Human Papillomavirus (HPV) Type Distribution in Females with Abnormal Cervical Cytology. A Correlation with Histological Study. *Open Virol J* 3: 60-6.
- Córdova, Z. M., Lugo, F. C., González, I. G., Calzadilla, D. d. V. (2009). Role of polymorphisms of recognition receptor from Toll patterns in case of transplant. *Revista Cubana de Medicina* 48: 88-100.
- Crozat, K., Beutler, B. (2004). TLR7: A new sensor of viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6835-6.
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17-27.
- Deane, J. A., Bolland, S. (2006). Nucleic acid-sensing TLRs as modifiers of autoimmunity. *J Immunol* 177: 6573-8.
- Edwards, A. O., Chen, D., Fridley, B. L., James, K. M., Wu, Y., Abecasis, G., Swaroop, A., Othman, M., Branham, K., Iyengar, S. K., Sivakumaran, T. A., Klein, R., Klein, B. E., Tosakulwong, N. (2008). Toll-like receptor polymorphisms and age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 1652-9.
- Fahey, L. M., Raff, A. B., Da Silva, D. M., Kast, W. M. (2009). Reversal of human papillomavirus-specific T cell immune suppression through TLR agonist treatment of Langerhans cells exposed to human papillomavirus type 16. *J Immunol* 182: 2919-28.
- Frazer, I. H. (2009). Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: A well evolved relationship *Virology* 384: 410-414.
- Guo, C. Y., Xu, X. F., Wu, J. Y., Liu, S. F. (2008). PCR-SSCP-DNA sequencing method in detecting PTEN gene mutation and its significance in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 14: 3804-11.
- Herbert, J., Coffin, J. (2008). Reducing Patient Risk for Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer *JAOA - J Am Osteopath Assoc* 108: 65-70.
- Hoory, T., Monie, A., Gravitt, P., Wu, T. C. (2008). Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc* 107: 198-217.
- Howley, P. M. (2006). Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papillomaviruses. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 117: 113-26.

- Hsueh, P.-R. (2009). Human papillomavirus, genital warts and vaccines *J Microbiol Immunol Infect* 42: 101-106.
- Insinga, R. P., Dasbach, E. J., Elbasha, E. H. (2009). Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. *BMC Infect Dis* 9: 119.
- Kadaja, M., Isok-Paas, H., Laos, T., Ustav, E., Ustav, M. (2009). Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS Pathog* 5, e1000397.
- Kawai, T., Akira, S. (2005). Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther* 7: 12-9.
- Kawai, T., Akira, S. (2007). TLR signaling. *Semin Immunol* 19: 24-32.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 388: 621-5.
- Lorenzi, J. C. C., Coelho-Castelo, A. A. M. (2008). Resposta Imune contra infecções virais. *Revista Campus* 1: 23-35.
- Moore, D. H. (2006). Cervical cancer. *Obstet Gynecol* 107: 1152-61.
- Mota, F., Rayment, N., Chong, S., Singer, A., Chain, B. (1999). The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol* 116: 33-40.
- Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., Meijer, C. J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348: 518-27.
- Musette, P., Auckbur, I. A., Begon, É. (2006). Immunité innée Expression cutanée et fonction des récepteurs Toll-like *Medecine / Science* 22: 149-52.
- Nam, K., Chung, S., Kim, J., Jeon, S., Bae, D. (2009). Factors associated with HPV persistence after conization in patients with negative margins. *J Gynecol Oncol* 20: 91-5.
- Nelson, K. M., Weiss, G. J. (2008). MicroRNAs and cancer: past, present, and potential future. *Mol Cancer Ther* 7: 3655-60.

- Nicol, A. F., Fernandes, A. T. G., Bonecini-Almeida, M. d. G. (2005). Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 1-12.
- Nobre, R. J., de Almeida, L. P., Martins, T. C. (2008). Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. *J Clin Virol* 42: 13-21.
- Odunsi, K., Terry, G., Ho, L., Bell, J., Cuzick, J., Ganesan, T. S. (1995). Association between HLA DQB1 * 03 and cervical intra-epithelial neoplasia. *Mol Med* 1: 161-71.
- Oh, D. Y., Baumann, K., Hamouda, O., Eckert, J. K., Neumann, K., Kucherer, C., Bartmeyer, B., Poggensee, G., Oh, N., Pruss, A., Jessen, H., Schumann, R. R. (2009). A frequent functional toll-like receptor 7 polymorphism is associated with accelerated HIV-1 disease progression. *Aids* 23: 297-307.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2766-70.
- Osada, H., Takahashi, T. (2007). MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 28: 2-12.
- Palefsky, J. (2006). Biology of HPV in HIV infection. *Adv Dent Res* 19: 99-105.
- Pyeon, D., Shane, M. P., Simon, M. L., Ahlquist, P., Lambert, P. F. (2009). Establishment of Human Papillomavirus Infection Requires Cell Cycle Progression *PLoS Pathogens* 5.
- Rakoff-Nahoum, S., Medzhitov, R. (2008). Role of toll-like receptors in tissue repair and tumorigenesis. *Biochemistry (Mosc)* 73: 555-61.
- Rosa, M. I., Medeiros, L. R., Rosa, D. D. (2009). Papilomavírus humano e neoplasia cervical *Cad. Saúde Pública* 25: 953-964.
- Schiffman, M., Clifford, G., Buonaguro, F. M. (2009). Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer* 4: 8.
- Schlecht, N. F., Kulaga, S., Robitaille, J. (2001). Persistent Human Papillomavirus Infection as a Predictor of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *J Am Med Assoc* 286: 3106-3114

- Schott, E., Witt, H., Neumann, K., Bergk, A., Halangk, J., Weich, V., Muller, T., Puhl, G., Wiedenmann, B., Berg, T. (2008). Association of TLR7 single nucleotide polymorphisms with chronic HCV-infection and response to interferon- α -based therapy. *J Viral Hepat* 15: 71-8.
- Smits, E. L., Ponsaerts, P., Berneman, Z. N., Van Tendeloo, V. F. (2008). The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *Oncologist* 13: 859-75.
- Soares, R. C., Oliveira, M. C., Souza, L. B. d., Costa, A. d. L. L., Pinto, L. P. (2008). Detection of HPV DNA and Immunohistochemical Expression of Cell Cycle Proteins in Oral Carcinoma in a Population of Brazilian Patients *J Appl Oral Sci* 16: 340-4.
- Stanley, M. (2006). Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 24: S16-22.
- Stanley, M. A., Pett, M. R., Coleman, N. (2007). HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans* 35: 1456-60.
- Staros, E. B. (2005). Innate immunity: New approaches to understanding its clinical significance. *Am J Clin Pathol* 123: 305-12.
- Strachan, T., Read, A. P. (2002). "Genética Molecular Humana," 2ª Ed/Ed. Artmed, São Paulo.
- Takeda, K., Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16: 3-9.
- Tsai, Y.-Y., Chang, C.-C., Chiang, C.-C., Yeh, K.-T., Chen, P.-L., Chi-Huang Chang, Ming-Chih Chou, Huei Lee, Cheng, Y.-W. (2009). HPV infection and p53 inactivation in pterygium *Molecular Vision* 15: 1092-1097.
- Videira, A. (2001). "Engenharia Genética, Princípios e Aplicações," Lidel, Lisboa.
- Waldemar, A. R., Corleta, H. V. E., Simoni, I., Edison, B. (2006). Molecular Biology of Cervical Cancer *Rev Bras Saúde Matern Infant* 6: 447-451.
- Wilting, S. M., Smeets, S. J., Snijders, P. J., vanWieringen, W. N., Mark A van de Wiel, Gerrit A Meijer, Bauke Ylstra, CRené Leemans, Chris JLM Meijer, Ruud H Brakenhoff, Braakhuis, B. J., Steenbergen, R. D. (2009). Genomic profiling identifies common HPV-associated chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of cervix and head and neck. *BMC Medical Genomics* 2: 32.
- Xagorari, A., Chlichlia, K. (2008). Toll-Like Receptors and Viruses: Induction of Innate Antiviral Immune Responses *Open Microbiol J* 2: 49-59.

- Yang, R., Murillo, F. M., Delannoy, M. J., Blosser, R. L., William H. Yutzy IV, Satoshi Uematsu, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Viscidi, R. P., Roden, R. B. S. (2005). B Lymphocyte Activation by Human Papillomavirus-Like Particles Directly Induces Ig Class Switch Recombination via TLR4-MyD88 *J Immunol* 174: 7912-9.
- Zak, D. E., Aderem, A. (2009). Systems biology of innate immunity. *Immunol Rev* 227: 264-82.